

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Nachweis FOXP3 positiver Zellen im Nierenzellkarzinom als Hinweis auf das Vorliegen einer Infiltration durch regulatorische T-Zellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Katharina Sell
aus Mainz

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 17.10.2011

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. A.J. Schrader

Korreferent: Prof. Dr. R. Moll

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS NIERENZELLKARZINOM.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie.....	2
1.1.3 Symptome, Prognose.....	4
1.1.4 Klassifikation und Subtypisierung.....	4
1.1.5 Grading.....	6
1.1.6 Stadieneinteilung.....	6
1.1.7 Therapie	8
1.2 IMMUNOLOGISCHE TOLERANZ.....	12
1.2.1 Zentrale Toleranz.....	12
1.2.2 Periphere Toleranz	13
1.3 REGULATORISCHE T-ZELLEN (TREGS)	16
1.3.1 Natürliche versus Induzierte Tregs	17
1.3.2 Wirkungsweise regulatorischer T-Zellen	20
1.3.3 Tregs in Tumoren.....	24
1.3.4 Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Therapie	27
1.4 ZIELSETZUNG	29
2 MATERIAL UND METHODEN.....	31
2.1 MATERIAL	31
2.1.1 Patientengut.....	31
2.1.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien.....	32
2.1.3 Chemikalien	34
2.1.4 Antikörper, Seren und immunhistochemische Kits.....	35
2.1.5 Molekularbiologische Kits	36
2.1.6 Primer	36
2.2 METHODEN.....	38
2.2.1 Immunhistochemische Methoden	38
2.2.1.1 Auswahl und Erstellung der Paraffinschnitte	38
2.2.1.2 Die HE-Färbung als Übersichtsfärbung	39
2.2.1.3 Prinzip der Immunhistochemie	39
2.2.1.4 Immunhistochemie am Paraffinschnitt.....	43
2.2.1.5 Auswertung der Immunhistochemie	47
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	48
2.2.2.1 Isolierung und Aufbereitung von RNA	48
2.2.2.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA	49
2.2.2.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	50

2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
2.2.2.5 Konventionelle RT-PCR	52
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	53
2.2.2.7 Quantitative real-time RT-PCR	54
2.2.2.8 Überprüfung der Spezifität der Amplifikation	55
2.2.2.9 Durchführung der quantitativen real time RT-PCR	56
2.2.2.10 Auswertung der real-time RT-PCR	58
3 ERGEBNISSE	60
3.1 ETABLIERUNG EINER IMMUNHISTOLOGISCHEN NACHWEISMETHODE VON FOXP3 POSITIVEN REGULATORISCHEN T-ZELLEN IN DER NIERE	60
3.2 REGULATORISCHE T- ZELLEN IM NIERENZELLKARZINOM	64
3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von FOXP3 positiven Zellen im Nierenzellkarzinom	64
3.2.2 Molekularbiologischer Nachweis von FOXP3 im Nierenzellkarzinom	70
3.2.3 Vergleich der Ergebnisse von PCR und Immunhistochemie	77
3.3 ETABLIERUNG EINER PARALLELFÄRBUNG VON CD4 UND FOXP3	78
4 DISKUSSION	84
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
PROTOKOLLE	96
ABKÜRZUNGS-, TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
TABELLENVERZEICHNIS	104
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	105
LITERATURVERZEICHNIS	107
ANHANG	
DANKSAGUNG	
VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	
LEBENS LAUF	
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer weltweiten Inzidenz von jährlich 4,7/100.000 für Männer und 2,5/100.000 für Frauen ist das Nierenzellkarzinom (NZK) nach dem Prostata- und Harnblasenkarzinom das dritthäufigste urologische Malignom (Okon, 2008). Es ist mit einem Anteil von über 80 % der häufigste maligne Tumor der Niere und macht etwa 2-3 % aller bösartigen Krebserkrankungen überhaupt aus (Okon, 2008; American Cancer Society, 2006). Das Auftreten des NZK variiert von Region zu Region, wobei die höchste Inzidenz in Nordamerika, Australien und einigen Ländern Europas beobachtet wird. Eine niedrige Inzidenz zeigt sich in Afrika und Asien (Curado *et al*, 2007; Pisani *et al*, 1993). Insgesamt ist die Inzidenz steigend (Baldewijns *et al*, 2008). Hierfür kann unter anderem auch ein zunehmender flächendeckender Einsatz von bildgebender Diagnostik verantwortlich gemacht werden, der vor allem zu einem Stadienshift geführt hat. Die Tumore werden heute früher erkannt - etwa 60 % der entdeckten Nierenzellkarzinome sind Zufallsbefunde im Rahmen orientierender Oberbauchsonografien.

Die Zahl der Neuerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland beträgt pro Jahr etwa 10.750 bei Männern und 6.500 bei Frauen; in diese Zahlen gehen jedoch zu etwa 10 % Karzinome des Nierenbeckens und des Harnleiters mit ein (Robert-Koch-Institut, 2004). Der Häufigkeitsgipfel des NZK liegt in der 6. Lebensdekade, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (Schrader *et al*, 2008). Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr sind selten (Siemer *et al*, 2006; Thompson *et al*, 2008); bei Kindern tritt die Erkrankung extrem selten auf (Estrada *et al*, 2005) (Abbildung 1).

Weltweit sterben jährlich über 100.000 Menschen am NZK (Ferlay *et al*, 2004). Die Mortalität liegt in Deutschland bei 9,7/100.000 für Männer und 6,2/100.000 für Frauen (Robert-Koch-Institut, 2004).

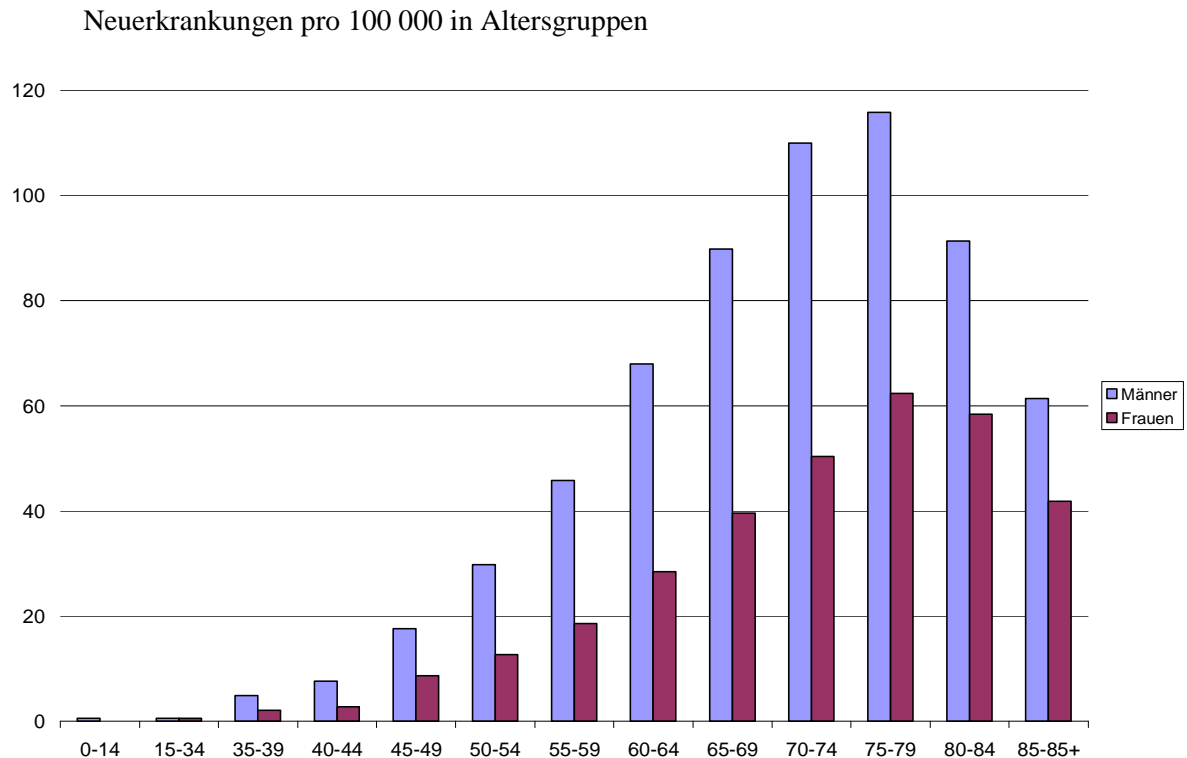


Abbildung 1 Schätzung der altersspezifischen Inzidenz des Nierenzellkarzinoms in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2004)

1.1.2 Ätiologie

Das NZK tritt häufig sporadisch auf, es gibt jedoch auch familiäre Formen, die etwa 4 % aller Nierenzellkarzinome ausmachen und mit genetischen Anomalien einhergehen (Okon, 2008). Hierzu gehört auch das mit dem Von-Hippel-Lindau (VHL)-Syndrom assoziierte NZK, welches häufig bilateral auftritt. Etwa 50-60 % aller Patienten mit VHL-Syndrom entwickeln meist multiple Nierenzellkarzinome (Grubb *et al*, 2005; Vira *et al*, 2007). Andere familiäre Formen sind das hereditäre papilläre NZK (Schmidt *et al*, 2004; Vira *et al*, 2007), die hereditäre Leiomyomatose mit Nierenzellkarzinom (Grubb *et al*, 2007), das Birt-Hogg-Dubé Syndrom (Roth *et al*, 1993; Vira *et al*, 2007) und die tuberöse Sklerose (Vira *et al*, 2007). Die familiären Formen manifestieren sich häufig bereits vor dem 40. Lebensjahr.

Die Ätiologie des Nierenkrebses ist bislang nicht vollständig geklärt. Für die Genese des klarzelligen NZK, der häufigsten Form, wird ein Verlust von genetischem Material des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p) als wesentlicher Mechanismus diskutiert (Kim & Kaelin, 2004; Lonser *et al*, 2003). Chromosom 3p-Deletionen werden bei 70-90 % der klarzelligen Nierenzellkarzinome beschrieben, jedoch selten bei anderen Formen

des NZK (Cohen & McGovern, 2005; Kovacs *et al*, 1988). Besonders betroffen sind die Regionen 3p12-14, 3p21 und 3p25, die sowohl bei sporadisch auftretenden als auch hereditären Formen des Nierenzellkarzinoms Verluste oder Mutationen aufweisen. Die Inaktivierung des auf Chromosomregion 3p25 lokalisierten Tumorsuppressorgens von Hippel Lindau (VHL) spielt bei der Entstehung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms eine entscheidende Rolle (Cohen & McGovern, 2005; Kaelin, 2007; Kim & Kaelin, 2004; Latif *et al*, 1993). Das VHL-Gen kodiert für ein Protein, das die Degradierung verschiedener Proteine bewirkt. Eine wichtige Zielstruktur des VHL-Proteins ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*), der unter anderem die Transkription proangiogenetischer Proteine wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TGF- β 1 (*transforming growth factor beta*) reguliert. Eine Inaktivierung des VHL-Gens führt somit über vermehrte Transkription dieser Proteine zu Stimulation von Zellwachstum und Angiogenese, welche eine entscheidende Rolle für Tumorstadium spielen (George & Kaelin, 2003; Kaelin, 2007; Kim & Kaelin, 2004; Maxwell *et al*, 1999). Um die Entstehung eines Nierentumors hervorzurufen, müssen beide DNA-Kopien des VHL-Gens inaktiviert sein. Dies kann über verschiedene Mechanismen geschehen, von denen Mutation (50-80 %), Deletion (60-80 %) und DNA-Methylierung (20-25 %) die häufigsten sind (Cheng *et al*, 2009).

Auch für die papilläre Form des NZK wurden charakteristische chromosomale Veränderungen beschrieben, wie die Trisomie der Chromosomen 7 und 17 sowie der Verlust des Y-Chromosoms (Cheng *et al*, 2009; Kovacs *et al*, 1991).

Es wurden bisher verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten des NZK beschrieben. Hierzu zählen Rauchen, Übergewicht und Hypertension (Chow *et al*, 2000; Dhote *et al*, 2000; Grossman *et al*, 2002; Pischon *et al*, 2006). Als weiterer Risikofaktor wird die Exposition gegenüber chemischen Noxen wie Asbest, Cadmium, Trichlorethylen, Benzin sowie Schwermetallen diskutiert (Mandel *et al*, 1995). Ein erhöhtes Risiko zeigen auch Patienten mit erworbener Nierenerkrankung, die besonders bei chronischen Dialysepatienten auftritt. Etwa 6 % dieser terminal niereninsuffizienten Menschen entwickeln ein NZK, wobei das Risiko mit zunehmender Dialysedauer steigt (Brennan *et al*, 1991; Truong *et al*, 1995).

Als protektive Faktoren werden körperliche Betätigung, Gemüse- und Obstreichhaltige Ernährung sowie moderater Alkoholkonsum diskutiert (Mahabir *et al*, 2005; Nicodemus *et al*, 2004).

1.1.3 Symptome, Prognose

Makrohämaturie, Flankenschmerz und palpabler Flankentumor gelten als klassische Symptomentrias des Nierenzellkarzinoms. Sie werden jedoch heute nur noch bei weniger als 10 % der Patienten beobachtet und weisen auf einen bereits fortgeschrittenen Lokalbefund hin (Mohammad & McClintock, 2007). Im Frühstadium ist das Nierenzellkarzinom oft asymptomatisch, weshalb etwa 25 % der Patienten bei Erstdiagnose bereits Metastasen aufweisen (Baldewijns *et al.*, 2008). Im fortgeschrittenen Stadium berichten Patienten über Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß sowie plötzlich aufgetretene Varikozelen bei Männern. Aufgrund ektooper Hormonbildung im Tumor entwickeln etwa 20 % der Patienten paraneoplastische Syndrome, von denen die häufigsten Hyperkalzämie, Anämie, Fieber, hepatische Dysfunktion, Erythrozytose und Amyloidose sind (Gold *et al.*, 1996). Das Nierenzellkarzinom metastasiert hämatogen mit absteigender Häufigkeit in die Lunge, in Lymphknoten, Knochen, Leber und ZNS (Maxwell *et al.*, 1999). Die zur Therapie führende Verdachtsdiagnose des Nierenzellkarzinoms wird radiographisch mittels CT gestellt und schließlich histologisch gesichert.

Als klassische prognostische Parameter gelten histologischer Subtyp, Tumordifferenzierung und -größe, eine Veneninvasion, der Nachweis regionaler Lymphknotenfiliae, die Anzahl und Lokalisation von Fernmetastasen sowie Alter und Allgemeinzustand des Patienten (Mejean *et al.*, 2003). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei organbegrenztem Tumorwachstum bei etwa 90 %, während sie bei fortgeschrittenem Tumor bei 60 % und bei bereits metastasiertem Karzinom bei nur noch 10 % liegt (Brenner, 2002).

1.1.4 Klassifikation und Subtypisierung

Histogenetisch handelt es sich beim NZK um eine heterogene Tumorentität. Verschiedene histologische, zytologische sowie zytogenetische Merkmale haben zu diversen Klassifikationen des Nierenzellkarzinoms geführt. Die in den neunziger Jahren entwickelte Mainzer Klassifikation (Thoenes & Storkel, 1991; Thoenes *et al.*, 1986) beruhte allein auf histologischen Aspekten, zog jedoch die histogenetische Herkunft als Basis der Klassifikation heran. Aufgrund zunehmender Kenntnis genetischer Veränderungen beim NZK entstanden weitere Klassifikationen, wie z.B. die

Heidelberger Klassifikation (Kovacs, 1993; Weiss *et al*, 1995), die das Verständnis von zytogenetischen Veränderungen und histologischen Kriterien integrierte.

Heute ist die von der WHO 2004 publizierte histopathologische Klassifikation der Nierentumore gebräuchlich (Tabelle 1) (Eble *et al*, 2004). Es werden sowohl histomorphologische als auch genetische Faktoren berücksichtigt. Die Klassifikation unterscheidet acht Subtypen des epithelialen Nierenzellkarzinoms sowie zwei benigne Nierentumore – das Onkozytom und das papilläre Adenom (Kim & Kaelin, 2004). Den häufigsten Subtyp bildet mit einem Anteil von etwa 70-80 % das dem proximalen Tubulusepithel entstammende klarzellige NZK, welches typischerweise ein klarzelliges, eosinophiles Zytoplasma sowie Deletionen auf Chromosom 3p aufweist (Kovacs *et al*, 1988). Papilläre Nierenzellkarzinome sind der zweithäufigste Subtyp (etwa 10-20 %) und zeigen ebenfalls typische genetische Veränderungen (Trisomie der Chromosomen 7 und 17 und Verlust des Y-Chromosoms). Sie wachsen häufig papillär, können aber auch in solider oder tubulopapillärer Form vorkommen und werden zudem in zwei weitere Typen unterteilt (Delahunt & Eble, 2005). Typ 1 weist kleine Zellen auf und zeigt potentiell ein weniger aggressives Tumorverhalten als der großzellige Typ 2 (Cohen & McGovern, 2005). Das chromophobe NZK macht einen Anteil von etwa 5 % aller Nierenzellkarzinome aus. Es zeigt genetisch einen Verlust der Heterozygotie von Chromosom 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 (Delahunt & Eble, 2005). Das chromophobe Nierenzellkarzinom hat eine deutlich bessere Prognose als andere Subtypen (Cohen & McGovern, 2005; Delahunt & Eble, 2005). Die weiteren Untergruppen des Nierenzellkarzinoms sind relativ selten; die richtige Zuordnung der Histopathologie hat jedoch entscheidenden Einfluss auf die Therapie.

Tabelle 1 WHO Klassifikation der epithelialen Nierentumoren (Eble *et al*, 2004)

WHO-Klassifikation der epithelialen Nierentumoren 2004	
maligne	Klarzelliges Karzinom Papilläres Karzinom Chromophobes Karzinom Sammelrohrkarzinom Medulläres Karzinom der Niere Karzinom assoziiert mit Neuroblastom Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom nicht näher klassifizierbares Nierenkarzinom
benigne	Papilläres Adenom Onkozytom

1.1.5 Grading

Die gebräuchlichste histopathologische Gradeinteilung (*Grading*) des Nierenzellkarzinoms ist die nach S. Fuhrmann (Fuhrman *et al*, 1982). Diese Einteilung richtet sich vor allem nach der Kern- und Nukleolusgröße sowie der Kernform und wird in vier Grade vorgenommen. Das Fuhrmann-Grading hat eine prognostische Bedeutung für das klarzellige Nierenzellkarzinom, nicht aber für die papilläre oder chromophobe Form (Tabelle 2).

Tabelle 2 Gradeinteilung des Nierenzellkarzinoms nach S. Fuhrmann (Fuhrman *et al*, 1982)

G1	Kerne: klein (ca 10 µm), rund und uniform Nukleolen: fehlend
G2	Kerne: größer (ca 15 µm), mit Irregularitäten Nukleolen: in 400-facher Vergrößerung erkennbar
G3	Kerne: noch größer (ca 20 µm), mit offensichtlichen Irregularitäten Nukleolen: in 100-facher Vergrößerung erkennbar
G4	Kerne: bizarr, oft mehrgelappt, Chromatinklumpen, Spindelzellen

1.1.6 Stadieneinteilung

Die Stadien des Nierenzellkarzinoms werden allgemein nach der TNM-Klassifikation der UICC (*Union Internationale Contre Cancer*) eingeteilt, wobei Ausbreitungsgrad, Größe und Metastasierung des Tumors berücksichtigt werden. In Tabelle 3 ist die TNM-Klassifikation dargestellt. Tabelle 4 zeigt die Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms entsprechend des AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

Tabelle 3 TNM-Klassifikation nach UICC (2002)

Primärtumor (T)	
T1	Tumor < 7cm in größter Ausdehnung, auf die Niere begrenzt
T1a	Tumor < 4cm in größter Ausdehnung, auf die Niere begrenzt
T1b	Tumor > 4cm < 7cm, auf die Niere begrenzt
T2	Tumor > 7cm in größter Ausdehnung, auf die Niere begrenzt
T3	Ausbreitung in größere Venen oder Infiltration von Nebenniere oder perirenalem Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerotafaszie
T3a	Ausbreitung direkt in perirenales Gewebe oder Nebenniere, jedoch nicht jenseits der Gerotafaszie
T3b	makroskopische Ausbreitung in Nierenvene oder infradiaphragmale Vena Cava
T3c	Ausbreitung in supradiaphragmale Vena Cava oder Infiltration der Venenwand
T4	Ausbreitung jenseits der Gerotafaszie
Regionale Lymphknoten (N)	
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in mehreren regionären Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 4 Stadieneinteilung entsprechend des AJCC

Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IV	T4	N0, N1	M0
	jedes T	N2	M0
	jedes T	jedes N	M1

1.1.7 Therapie

Operative Verfahren

In der Behandlung des NZK haben Strahlentherapie und systemische Therapie nur eine begrenzte Wirksamkeit. Die radikale Tumorchirurgie steht daher an erster Stelle und stellt bis heute bei kompletter Resektabilität die einzige kurative Therapieoption dar (Lam *et al*, 2004).

Organerhaltende Tumoresektion

Die organerhaltende Tumoresektion ist die Therapie der Wahl des nicht metastasierten NZK. Als imperative Indikationen hierfür gelten Patienten mit funktioneller Einzelniere, bilaterale Tumore sowie eine hochgradig eingeschränkte Funktion der kontralateralen Niere. Voraussetzungen für die organerhaltende Tumorenukleation sind eine komplette Resezierbarkeit des Tumors unter Funktionserhalt der Niere sowie Tumorfreiheit der Absetzränder.

Auch bei kleineren (<4 cm) lokal begrenzten Tumoren ohne imperative Indikation sollte alternativ zur radikalen Tumornephrektomie immer eine organerhaltende Operation erwogen werden (Hafez *et al*, 1999). Einige Studien konnten zeigen, dass sich der Organerhalt weder auf die rezidivfreie Zeit noch auf das Langzeitüberleben negativ auswirkt (Kirkali *et al*, 2007; Novick, 2004).

Radikale Tumornephrektomie

Falls aus onkologischer oder chirurgischer Sicht eine partielle Nephrektomie oder Tumorenukleation nicht möglich ist, erfolgt die radikale Tumornephrektomie. Hierbei erfolgt nach Darstellung und Ligatur der Nierengefäße sowie des Ureters eine *en-bloc* Resektion von Gerotafaszie, darin enthaltener Nierenfettkapsel inklusive primärer Lymphbahnen, der Niere sowie der parakavalen bzw. paraaortalen Lymphknoten. Die Entfernung der Nebenniere wird kontrovers diskutiert, da die Häufigkeit von Metastasen hier mit 1,4-5 % als gering zu betrachten ist und meist mit weiteren Metastasen einhergeht (Siemer *et al*, 2004). Je nach Tumorstadium und Lokalisation des Tumors in der Niere wird ein abdomineller/transperitonealer oder ein interkostaler/retroperitonealer Zugang, selten ein thorakoabdominaler Zugang gewählt (Lang & Jacqmin, 2003).

Etwa 4-9 % aller Patienten weisen einen Tumorzapfen in der Vena renalis bzw. der Vena cava auf (Sigman *et al*, 1999). Eine sorgfältige Entfernung des gesamten Tumorzapfens sollte erfolgen – notfalls unter partieller Resektion der Vena cava. Dies kann im Einzelfall sogar den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine erforderlich machen. Die Ausdehnung des Tumorzapfens bei kompletter Resektabilität korreliert nicht mit der Prognose (Kuczyk *et al*, 1997).

Sowohl die Tumornephrektomie als auch die organerhaltende Nierentumorresektion können auch laparoskopisch durchgeführt werden. Während sich die laparoskopische Tumornephrektomie für T1 und T2 Tumore bereits etabliert hat, werden organerhaltende Tumorenukleationen bisher weitestgehend in offen-chirurgischer Technik durchgeführt. Die Vorteile der minimalinvasiven Chirurgie liegen im geringeren postoperativen Schmerzmittelbedarf, im verkürzten Krankenhausaufenthalt und der schnelleren Rekonvaleszenz (Dillenburg *et al*, 2006). Größere oder fortgeschrittene Tumore sollten jedoch weiterhin offen operiert werden (Dave *et al*, 2005).

Systemische Therapie

Die Prognose des metastasierten NZK ist generell schlecht. Die zytostatische Chemotherapie weist beim NZK im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten, wenn überhaupt, nur eine marginale Wirksamkeit auf. Ansprechraten von wenigstens 5-10 % konnten in größeren Studien nur durch Vinblastin und 5-FU erzielt werden, jedoch meist ohne Verlängerung des Gesamtüberlebens (Motzer *et al*, 2000).

Jahrzehnte lang war die Immun(chemo)therapie die einzige Option der medikamentösen Behandlung des metastasierten NZK. In den letzten Jahren führte jedoch der Einsatz neuer Substanzen aus dem Bereich der „targeted“, das heißt zielgerichteten Therapie, zu einem Wandel in der Behandlung des metastasierten NZK. Besonderen Erfolg zeigen hierbei Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren, mTOR (*mammalian target of rapamycin*) - Inhibitoren und spezifische monoklonale Antikörper (Schrader & Hofmann, 2008). Das NZK ist eine der ersten Tumorentitäten bei denen zielgerichtete Substanzen sehr erfolgreich eingesetzt werden. Die Therapie erfolgt risikoratifiziert. Der MSKCC-Score (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*) ordnet das klarzellige metastasierte NZK anhand mehrerer Risikofaktoren verschiedenen Prognosegruppen zu (Motzer *et al*, 2002).

MSKCC- Risikofaktoren

1. LDH > 1,5-fach der Norm
2. Hämoglobin Männer < 13 g/dl, Frauen < 11,5 g/dl
3. Korrigiertes Serum-Calcium > 2,5 mmol/l
4. Karnofsky-Index < 80 %
5. Intervall zwischen Diagnose und systemischer Therapie < 1 Jahr

Anhand der Anzahl der Risikofaktoren werden die drei Prognosegruppen „gut“ (keine Risikofaktoren), „intermediär“ (1 oder 2 Risikofaktoren) und „schlecht“ (3, 4 oder 5 Risikofaktoren) unterschieden.

Nach den Leitlinien der EAU (*European Association of Urology*, 2007) wird derzeit als Erstlinienbehandlung bei Patienten mit guter oder intermediärer MSKCC-Prognose Sunitinib empfohlen (Ljungberg *et al*, 2007)). Sunitinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der unter anderem die Signaltransduktion am VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) und PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) hemmt. Außerdem erwies sich die Kombination des monoklonalen VEGF-bindenden Antikörpers Bevacizumab mit Interferon- α in der guten und intermediären MSKCC-Prognosegruppe beim rein klarzelligen Tumor als wirksam und ist als Erstlinienpräparat zugelassen (Escudier *et al*, 2007). Für die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem NZK, bei denen eine Therapie mit Interferon- α oder Interleukin-2 versagt hat oder die für eine derartige Therapie nicht geeignet sind, wird das Zweitlinienpräparat Sorafenib, ebenfalls ein Multikinaseinhibitor, empfohlen (Ljungberg *et al*, 2007). Einige Studien konnten auch für den sequenziellen Einsatz von Sunitinib und Sorafenib signifikante Wirksamkeit zeigen (Dutcher *et al*, 2008; Sepulveda *et al*, 2008).

Neue Möglichkeiten bietet auch die Substanzgruppe der mTOR-Inhibitoren, die in der Behandlung des metastasierten NZK bereits deutliche Effekte gezeigt hat (Hudes *et al*, 2007). Die Proteinkinase mTOR reguliert unter anderem das Zellwachstum, die Zellproliferation und Proteinsynthese von Zellen. Eine Dysregulation führt in Tumoren zu unkontrolliertem Zellwachstum. Vielversprechend ist, dass der mTOR-Inhibitor Temsirolimus insbesondere bei Patienten mit schlechter Prognose sowie Patienten mit nicht klarzelligem NZK signifikante Wirkung erzielt hat, während oben genannte Therapieansätze bei diesen Patienten bisher deutlich schlechtere Wirkung zeigten (Dutcher *et al*, 2007; Hudes *et al*, 2007). In Europa ist Temsirolimus zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem NZK und schlechter Prognose zugelassen.

Eine Kombination der verschiedenen Substanzen konnte, mit Ausnahme der Kombination Bevacizumab und Interferon- α , bisher keine längerfristigen therapeutischen Vorteile gegenüber der jeweiligen Monotherapie zeigen.

Unabhängig von der medikamentösen Therapie sollten Patienten mit metastasiertem NZK nach Möglichkeit vor Einleiten der Therapie operiert werden. Subgruppenanalysen deuten darauf hin, dass (wie bei der systemischen Zytokintherapie) auch Patienten, die eine systemische Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren erhalten, von einer operativen Entfernung des Primärtumors vor Einleitung der Therapie profitieren (Motzer *et al*, 2007). Auch die Resektabilität der Metastasen sollte weiterhin geprüft werden, da hierdurch eine Verbesserung von Allgemeinzustand und Lebenserwartung der Patienten erreicht werden kann (Ghysel *et al*, 2006; Staehler *et al*, 2008).

Die Interleukin-2-basierte Immuntherapie kann heute allenfalls bei jüngeren Patienten mit klarzelligem Tumor, guter Prognose, ohne viszeraler Metastasen und ohne Vorbehandlung erwogen werden.

Die neue zielgerichtete Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms ermöglicht in vielen Fällen eine prolongierte Erkrankungsstabilisation. Es bleibt jedoch trotz ermutigender Ergebnisse zu erwähnen, dass bislang keine der Substanzen kuratives Potenzial besitzt und das metastasierte Nierenzellkarzinom weiterhin eine nicht heilbare Tumorerkrankung ist.

1.2 Immunologische Toleranz

Eine der großen Herausforderungen des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen Selbst und Nicht-Selbst. Während eine effektive Immunantwort gegen die Vielzahl möglicher Pathogene generiert werden muss, soll zum anderen eine Immunreaktion gegen körpereigene Gewebebestandteile verhindert werden. Schon vor über 100 Jahren vermutete Paul Ehrlich eine ausgefeilte regulatorische Vorrichtung, die den Organismus vor einem „Horror autotoxicus“, einer Autoimmunreaktion, schütze (Steinman & Nussenzweig, 2002). Die Fähigkeit des Immunsystems, körpereigene Substanzen und Gewebe als solche zu erkennen und nicht zu bekämpfen, bezeichnet man als immunologische Toleranz. Verschiedene Mechanismen tragen zur Induktion und Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz bei und lassen sich in zentrale sowie periphere Mechanismen unterteilen.

1.2.1 Zentrale Toleranz

Bereits während der embryonalen T-Zell-Reifung im Thymus werden autoreaktive T-Zellen durch programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Ein Vorgang, den Burnet 1957 erstmals als klonale Deletion beschrieb (Burnet, 1957). Hierbei präsentieren medulläre Thymusepithelzellen sowie professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC) den heranreifenden T-Lymphozyten zahlreiche körpereigene Antigene (McCaughy & Hogquist, 2008). Der Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*) ermöglicht den Thymusepithelzellen dabei die Expression verschiedenster extrathymaler Selbst-Antigene, so zum Beispiel der Antigene pankreatischer β -Zellen (Anderson *et al*, 2002). Bindet nun ein T-Lymphozyt mit seinem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit hoher Affinität an ein solches präsentiertes Selbst-Antigen, so leitet ein zelluläres Signal den programmierten Zelltod ein. Potentiell autoreaktive T-Zellen werden somit bereits im Thymus eliminiert. Diesen zentralen Mechanismus der Toleranzinduktion nennt man Negativselektion (Nossal, 1994).

1.2.2 Periphere Toleranz

Dennoch gibt es autoreaktive T-Zellen, die dieser Negativselektion entkommen und in die Peripherie gelangen, wo sie weiterer Kontrollmechanismen bedürfen (Fife & Bluestone, 2008). Zur Aufrechterhaltung der Toleranz in der Peripherie sind intrinsische sowie extrinsische Mechanismen beschrieben (Peggs *et al*, 2008). Zu den intrinsischen Mechanismen zählen solche, die den T-Zellen selbst innewohnen. Zwei wesentliche Mechanismen sind hierbei Anergie und (periphere) klonale Deletion. Als extrinsisch bezeichnet man Kontrollmechanismen, die von anderen Zellpopulationen ausgehen. Entscheidende Funktion haben hierbei regulatorische T-Zellen und dendritische Zellen. Ein komplexes Zusammenspiel dieser Mechanismen sorgt für die Aufrechterhaltung eines immunologischen Gleichgewichts.

Die molekulare Basis Zell-intrinsischer Kontrollmechanismen bildet eine Gruppe aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf der T-Zell-Oberfläche (Peggs *et al*, 2008). Sie gehören im Wesentlichen der CD28:B7 Immunglobulin Superfamilie an, die eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von Immunreaktionen spielt (Korman *et al*, 2006). Die verschiedenen Rezeptoren erkennen Liganden auf vornehmlich APC und generieren einen Kostimulus während der Interaktion von T-Zelle und APC. Während die Rezeptoren CD28 und ICOS (*inducible T-cell costimulator*) kostimulatorisch auf die T-Zell Aktivierung wirken, üben die Rezeptoren CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), PD-1 (*programmed death-1*) und BTLA (*B-and T-lymphocyte attenuator*) ko-inhibitorische Funktion aus (Greenwald *et al*, 2005; Peggs *et al*, 2008; Salomon & Bluestone, 2001). Als Liganden sind die 7 Mitglieder der B7-Familie B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ICOS-L, PD-L1, PD-L2, B7-H3 und B7x bekannt (Greenwald *et al*, 2005; Peggs *et al*, 2008).

Bisher am besten charakterisiert ist der CD28/CTLA-4:B7-1/B7-2 Signalweg. Die Rezeptoren CD28 und CTLA-4 sind beide spezifisch für die Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die auf APC exprimiert werden. Während die Bindung eines Liganden an CD28 die T-Zelle aktiviert, vermittelt CTLA-4 allerdings ein inhibitorisches Signal (Chambers *et al*, 2001; Salomon & Bluestone, 2001; Salomon *et al*, 2001).

Wie bereits Anfang der 90er Jahre postuliert benötigen T-Zellen für ihre Aktivierung neben der spezifischen TCR-Stimulation ein zusätzliches kostimulatorisches Signal (Hathcock *et al*, 1994; Linsley *et al*, 1991). Erst dann können sie IL-2 produzieren, klonal expandieren und ihre Effektorfunktion ausüben. Versuche an Mäusen konnten zeigen, dass die Blockade von B7-1 sowie B7-2 zu verminderter T-Zell Antwort führte. Ebenso zeigte der Verlust von CD28 in Mäusen eine verminderte T-Zell Aktivität (Kundig *et al*, 1996; Lenschow & Bluestone, 1993; Shahinian *et al*, 1993). Der Rezeptor CD28 wird konstitutiv auf T-Zellen exprimiert (Gross *et al*, 1990). Eine Bindung der auf APC vorkommenden Liganden B7-1 beziehungsweise B7-2 führt in der T-Zelle zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate von IL-2, welches für Proliferation, Differenzierung und Überleben der T-Zelle wichtig ist (Boise *et al*, 1995; Thompson *et al*, 1989). CD28 wirkt somit synergistisch mit der spezifischen Stimulation des TCR, die ebenfalls zu vermehrter Transkription von IL-2 führt und verstärkt dadurch das TCR-Signal. Eine Bindung des Liganden an CD28 setzt also die Aktivierungsschwelle von T-Zellen herab. Durch die Kostimulation werden weniger TCR-Stimulationen benötigt, um eine T-Zell Antwort zu generieren (Diehn *et al*, 2002; Viola & Lanzavecchia, 1996). Erkennt eine T-Zelle spezifisch ihr Antigen ohne jedoch gleichzeitig ein kostimulatorisches Signal über CD28 zu erhalten, so wird sie apoptotisch oder geht in einen Zustand der Anergie über. Dies bedeutet, dass die T-Zelle zwar erhalten bleibt, jedoch nicht in der Lage ist zu proliferieren und IL-2 zu produzieren. Eine anerge T-Zelle kann auch nach wiederholter TCR-Stimulation, selbst wenn dann ein kostimulatorisches Signal vorliegt, nicht mehr aktiviert werden (Bretscher, 1999; Falb *et al*, 1996). Die für die Kostimulation benötigten Liganden B7-1 und B7-2 werden auf unreifen, nicht aktivierten APC allerdings kaum exprimiert. Erst die Aktivierung der APC, zum Beispiel im Rahmen einer Entzündung oder Gewebeverletzung, führt zu vermehrter Bildung von B7-Molekülen (Hathcock *et al*, 1994). Das bedeutet, dass APC in gesundem Gewebe durch fehlende Kostimulation mittels B7-1 bzw. B7-2 bei einer TCR-Stimulation zu einer Induktion anerer, also inaktiver T-Zellen führen. Sie erhalten somit die periphere Toleranz potentiell autoreaktiver T-Zellen gegenüber gesundem körpereigenem Gewebe. Erst ein inflammatorisches Milieu führt zur Expression der für die T-Zell-Aktivierung benötigten Kostimulatoren. Die Induktion von Anergie ist ein wesentlicher Mechanismus der peripheren Toleranz.

CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor auf der T-Zell-Oberfläche dessen Signalkaskade über multiple Mechanismen zu verminderter Zytokinproduktion, einem Zellzyklusarrest und somit zur Hemmung der T-Zell-Aktivierung führt (Chikuma *et al*, 2003; Walunas *et al*, 1996). CTLA-4 zeigt eine etwa 10-fach stärkere Affinität gegenüber B7-1 und B7-2 als CD28 (Collins *et al*, 2002). Einige Daten weisen darauf hin, dass CTLA-4 und CD28 vor allem bei niedrigen Konzentrationen an B7-1 und B7-2 um ihren Liganden konkurrieren (Greene *et al*, 1996; Peggs *et al*, 2008). Aufgrund der höheren Affinität von CTLA-4 zu den Liganden, hemmt dieses die Kostimulation der T-Zelle mit CD28. CTLA-4 könnte somit indirekt zur Induktion von Anergie beitragen (Greenwald *et al*, 2001) und damit in gesundem Gewebe (wenn B7-1 beziehungsweise B7-2 wenig exprimiert wird) den Erhalt der peripheren Toleranz ermöglichen.

Da CTLA-4 vor allem nach der Aktivierung von T-Zellen hochreguliert wird (Lindsten *et al*, 1993), könnte der Rezeptor durch seine Inhibition der T-Zell Aktivität eine wichtige Rolle bei der Verhinderung überschießender Immunreaktionen spielen. Die Bedeutung von CTLA-4 als negativem Regulator von aktivierten T-Zellen konnte an Mäusen gezeigt werden, deren Gen für CTLA-4 ausgeschaltet wurde. Sie entwickelten eine schnell tödlich verlaufende lymphoproliferative Erkrankung (Chambers *et al*, 1997; Waterhouse *et al*, 1995).

Eine ständige Feinregulation der T-Zellantwort durch die beiden Gegenspieler CD28 und CTLA-4 scheint ein wesentlicher Mechanismus zum Erhalt des immunologischen Gleichgewichts zu sein. Die zahlreichen kostimulatorischen Moleküle weiter zu charakterisieren bleibt Gegenstand der Forschung und wird helfen die Regulationsmechanismen von T-Zellen in der Peripherie besser zu verstehen.

Ein weiterer intrinsischer Mechanismus, autoreaktive T-Zellen in der Peripherie zu eliminieren, ist die klonale Deletion. Die kontinuierliche Stimulation einer T-Zelle mit ihrem Antigen deutet möglicherweise auf die Spezifität der T-Zelle für ein Selbst-Antigen hin. Eine wiederholte Stimulation einer T-Zelle leitet daher die klonale Deletion durch einen Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation induced cell death*) ein (Janssen *et al*, 2000; Krueger *et al*, 2003).

Als extrinsische Mechanismen der peripheren Toleranz bezeichnet man die aktive Kontrolle autoreaktiver T-Zellen durch bestimmte regulatorische Zellpopulationen. Eine entscheidende Rolle kommt hier den regulatorischen T-Zellen (Tregs) zu, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

Die Fähigkeit des Immunsystems körpereigenes Material als solches zu erkennen und nicht zu bekämpfen beruht also auf einem komplexen Zusammenspiel von zentralen und peripheren Toleranzmechanismen. Autoreaktive T-Zellen, die während ihrer Reifung der negativen Selektion im Thymus entkommen, werden in der Peripherie weiter kontrolliert. Zell intrinsische Mechanismen können in T-Zellen Anergie, einen inaktiven Zustand, induzieren oder bei ständig aktivierten T-Zellen die klonale Deletion einleiten. Regulatorische T-Zellen haben als aktive Immunregulatoren eine wichtige Aufgabe in der Erhaltung der peripheren Toleranz. Die Bedeutung der Selbsttoleranz zeigen die schwerwiegenden Autoimmunerkrankungen in Organismen, in denen das faszinierende System der Toleranzerhaltung aus dem Gleichgewicht geraten ist.

1.3 Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Regulatorische T-Zellen sind eine heterogene Gruppe von T-Zellen unterschiedlicher Herkunft, die wesentlich zum Erhalt des immunologischen Gleichgewichts beitragen. Durch die Beeinflussung der Aktivität anderer Zelltypen können sie das Immunsystem kontrollieren. Sie regulieren die Immunantwort gegen gewebeeigene Antigene und schützen den Organismus so vor Autoimmunität und überschießender Immunreaktion. Als Regulatoren der Immunantwort spielen sie zudem eine Schlüsselrolle bei Infektionen, allergischen Reaktionen, Tumorummunologie und Transplantatakzeptanz. Bereits Anfang der 70er Jahre beschrieben Gershon *et al.* (Gershon & Kondo, 1970) T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften. Weitere Beobachtungen bekräftigten die Annahme einer immunmodulatorischen T-Zellpopulation. So führte die neonatale Thymektomie bei Mäusen zur Entwicklung schwerer Autoimmunsyndrome, die durch die Übertragung von CD4⁺ T-Zellen von Wildtypmäusen verhindert werden konnte (Kojima & Prehn, 1981). Trotz dieser wichtigen Erkenntnisse wurde die Idee der regulatorischen T-Zellen lange Zeit vernachlässigt. Erst Mitte der 90er Jahre rückten Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi *et al.*, 1995) Tregs wieder in den Mittelpunkt der immunologischen Forschung. Mit dem Nachweis eines phänotypischen Markers regulatorischer T-Zellen lieferten sie die Grundlage für die heutige Renaissance auf dem Gebiet der Treg-Forschung.

Tregs werden aufgrund ihrer Herkunft in dem Thymus entstammende *natürliche regulatorische T-Zellen* (nTreg) sowie in der Peripherie *induzierte regulatorische T-Zellen* (iTreg) unterteilt.

1.3.1 Natürliche versus Induzierte Tregs

Natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) entstehen im Thymus als spezialisierte Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen und machen etwa 10-15 % aller CD4⁺ T-Zellen insgesamt aus (Murphy *et al*, 2008). Sie exprimieren das Zelloberflächenmolekül CD25 (Interleukin-2-Rezeptorkette- α) sowie den Transkriptionsfaktor FOXP3 (*forkhead box P3*), der für die Entwicklung und Funktion der Tregs entscheidend ist (Murphy *et al*, 2008). 1995 zeigten Sakaguchi *et al.*, dass eine verminderte Expression der Interleukin-2-Rezeptorkette- α (CD25) in Mäusen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führte (Sakaguchi *et al*, 1995). Sie beschrieben CD25 als phänotypischen Marker für regulatorische T-Zellen. CD25 erwies sich jedoch als unspezifisch für Tregs, da auch aktivierte nicht regulatorische T-Zellen CD25 exprimieren (Horwitz *et al*, 2008b; Wang, 2006). Als weitere Marker wurden unter anderem GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) (Shimizu *et al*, 2002), CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) (Read *et al*, 2000), Selectin L, CCR7 (*chemokin (c-c motif) receptor 7*) (Szanya *et al*, 2002) und der bis vor kurzem verlässlichste Marker FOXP3 (Fontenot *et al*, 2003; Hori *et al*, 2003) beschrieben. Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors FOXP3 für Tregs wurde deutlich, nachdem Mutationen im FOXP3 Gen als Ursache einer schweren lymphoproliferativen Störung bei Scurfy Mäusen sowie einer systemischen Autoimmunerkrankung, dem IPEX-Syndrom, beim Menschen erkannt wurden (Bennett *et al*, 2001; Brunkow *et al*, 2001). Das schnell tödlich verlaufende X-chromosomal vererbte Syndrom mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX) ist eine seltene Erkrankung, die innerhalb des ersten Lebensjahres auftritt. Sie ist auf einen Mangel an funktionellen Tregs zurückzuführen.

Natürliche Tregs werden bei der T-Zellreifung vermutlich über eine intermediäre Affinität zu MHC-Molekülen selektiert. T-Zellen mit niedriger Affinität differenzieren zu T-Helferzellen, während T-Zellen mit hoher Affinität apoptotisch werden (Fontenot & Rudensky, 2005). Eine Kostimulation mit CD28 (Tai *et al*, 2005) ist für die Entwicklung natürlicher regulatorischer T-Zellen erforderlich. Zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion benötigen sie die Zytokine TGF- β und IL-2 (Fontenot *et al*, 2005; Marie *et al*, 2005). IL-6 hingegen bewirkt die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen zu T-Helfer-17-Zellen (T_{H17}), die keine regulatorische Funktion mehr aufweisen (Horwitz *et al*, 2008a).

Neben den natürlichen Tregs aus dem Thymus gibt es eine heterogene Gruppe **induzierter Tregs** (iTreg), die aus naiven $CD4^+CD25^-$ oder $CD8^+CD25^-$ T-Zellen in der Peripherie entstehen (Bach, 2003; Roncarolo & Levings, 2000). Auch natürliche Killerzellen (NK) sowie $CD4^-CD8^-$ Zellen können regulatorische Eigenschaften aufweisen (Tang & Bluestone, 2008). Die Gruppe induzierter Tregs umfasst Zellen mit verschiedenen Phänotypen und Eigenschaften. Sie werden durch Immunmodulatoren und Antigen präsentierende Zellen stimuliert. So induzieren Interleukin-10 und möglicherweise Interferon- α die regulatorischen *Tr1-Zellen* (T regulatorisch 1) sowie *Th3-Zellen* (T Helfer 3). Diese $CD4^+$ Zellen üben regulatorische Funktion aus, exprimieren jedoch nicht konstitutiv den Transkriptionsfaktor FOXP3 (Levings & Roncarolo, 2005; Vieira *et al*, 2004). Eine Aktivierung dieser Zellen kann zu einer Hochregulation von FOXP3 führen, jedoch konnten regulatorische Eigenschaften dieser Zellen auch ohne die Anwesenheit von FOXP3 beobachtet werden (Gregori *et al*, 2007). Tr1-Zellen sezernieren das antiinflammatorische Interleukin-10. Unreife dendritische Zellen könnten möglicherweise ein Stimulusfaktor für die Differenzierung der Tr1-Zellen sein, um in Abwesenheit von Infektionen die Toleranz aufrechtzuerhalten (Murphy *et al*, 2008). Th3-Zellen üben ihre suppressive Funktion über die Produktion von TGF- β aus und kommen im Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebe vor. Sie stehen in Zusammenhang mit oraler Toleranz (Murphy *et al*, 2008).

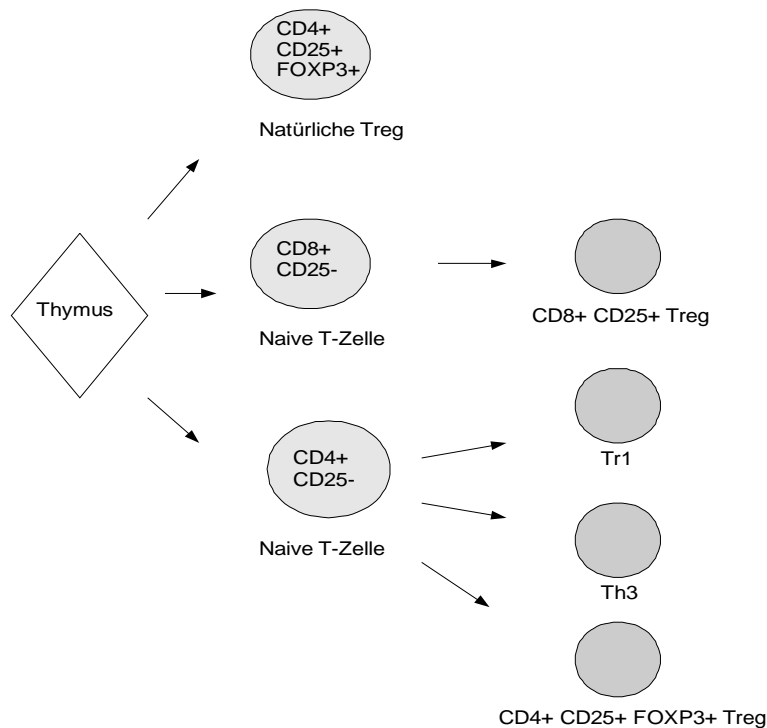


Abbildung 2 Subpopulationen regulatorischer T-Zellen. Neben natürlichen Tregs, die direkt aus dem Thymus hervorgehen, gibt es eine Reihe induzierter regulatorischer T-Zellen. Immunmodulatoren und APC induzieren die Konversion naiver $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen in regulatorische T-Zellen. Treg = regulatorische T-Zelle, Tr1 = regulatorische Typ 1 Zelle, Th3 = T Helfer 3 Zelle.

Des Weiteren kann $TGF-\beta$ zusammen mit Interleukin-2 die Differenzierung von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Zellen induzieren (Zheng *et al*, 2002). Die Kostimulation mit CTLA4 wird hierbei benötigt (Zheng *et al*, 2006). Diese Gruppe induzierter Tregs besitzt einen den natürlichen Tregs sehr ähnlichen Phänotyp.

Trotz der vielen beschriebenen Merkmale bleibt die Isolierung regulatorischer T-Zellen jedoch nach wie vor schwierig, da absolut spezifische Marker noch immer fehlen.

Auch zeigt sich der Transfer des aus Untersuchungen an Mäusen erlangten Wissens über regulatorische T-Zellen auf den Menschen problematisch. Während im Mausmodell $CD4^+CD25^+$ T-Zellpopulationen zum größten Teil aus regulatorischen Zellen bestehen (Banham *et al*, 2006), erweist sich die Identifizierung von Tregs beim Menschen als weitaus schwieriger. Einige Marker, die mit regulatorischer Funktion assoziiert sind, wie die Oberflächenmoleküle CD25, CTLA4, GITR, kommen ebenso auf aktivierten T-Zellen vor (Banham *et al*, 2006). Sie erlauben somit keine Unterscheidung zwischen Tregs und aktivierten T-Zellen. Der Transkriptionsfaktor FOXP3, der bislang als zuverlässigster Marker für regulatorische Funktion gilt, konnte

zu einem geringen Anteil auch in nicht regulatorischen CD25⁻ Zellen nachgewiesen werden (Morgan *et al*, 2005). Außerdem zeigen auch Zellen, die FOXP3 nicht exprimieren, regulatorische Funktion; so zum Beispiel Tr1-Zellen und Th3-Zellen (Vieira *et al*, 2004). Einige Daten weisen zudem darauf hin, dass im Gegensatz zum Mausmodell eine Überexpression von FOXP3 in humanen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen nicht ausreicht, um eine potente suppressive Funktion zu erzielen (Allan *et al*, 2005). Es lassen sich demnach zusätzliche Faktoren, die in der Entwicklung, Differenzierung und Funktion der Tregs eine wesentliche Rolle spielen, vermuten. Um regulatorische T-Zellen klar von aktivierten T-Zellen zu unterscheiden, sind also weitere Kriterien erforderlich. So scheint eine starke Expression von CD25 (CD25^{high}), im Vergleich zu intermediärer oder schwacher Expression, charakteristisch für regulatorische T-Zellen zu sein (Baecher-Allan *et al*, 2001). Mehrere Studien beschreiben außerdem eine Downregulation der Expression des IL-7-Rezeptors CD127 als mögliches Unterscheidungskriterium T-regulatorischer Zellen von aktivierten T-Zellen (Fazekas de St Groth *et al*, 2006; Griffiths *et al*, 2007; Liu *et al*, 2006). Andere Autoren erklären eine Koexpression von CD27 mit CD25 als spezifisch für Tregs (Gattorno *et al*, 2005). Weitere Forschung ist auf diesem Gebiet erforderlich. Bis heute gilt FOXP3 als spezifischster Marker für regulatorische T-Zellen.

1.3.2 Wirkungsweise regulatorischer T-Zellen

Die Wirkungsweise regulatorischer T-Zellen wurde in vielen *in vitro* Modellen sowie in einigen *in vivo* Krankheitsmodellen untersucht. Nach Beobachtungen regulatorischer T-Zellen *in vitro* ging man zunächst davon aus, dass ihre regulatorische Funktion Zellkontakt abhängig sei. Heute werden multiple Mechanismen der Treg vermittelten Suppression *in vivo* diskutiert.

Regulatorische T-Zellen werden zunächst durch die spezifische Stimulation ihres TCR aktiviert. Mittels der Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β können regulatorische T-Zellen Effektor-T-Zellen, NK sowie Antigen präsentierende Zellen supprimieren (Chen *et al*, 2005; Ghiringhelli *et al*, 2005a; Peng *et al*, 2004). Aktivierte regulatorische T-Zellen exprimieren auch membrangebundenes TGF- β (Oida *et al*, 2006). TGF- β hemmt die IL-2 Produktion von aktivierten T-Zellen, die diese zur Proliferation, Differenzierung und zum Überleben benötigen. Außerdem erschwert

TGF- β die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen und führt zu einer Upregulation von Zellzyklusinhibitoren (Gorelik *et al*, 2002; Gorelik & Flavell, 2002; Heath *et al*, 2000). Die antiinflammatorischen Zytokine hemmen die T-Zell Aktivierung durch Inhibition der Expression der für die T-Zell Aktivierung benötigten Moleküle CD80 und CD86 auf Antigen präsentierende Zellen. Durch Verminderung der Expression von MHC-Molekülen verhindert TGF- β zudem die Präsentation von Antigenen durch Antigen präsentierende Zellen und stört somit deren Funktion (Gorelik & Flavell, 2002). Regulatorische T-Zellen können durch die Sekretion von TGF- β die Differenzierung naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen induzieren. In Anwesenheit von IL-2 bewirkt TGF- β die Expression von FOXP3 in naiven T-Zellen. Diese Fähigkeit der Tregs wird als infektiöse Toleranz bezeichnet (Shevach *et al*, 2008). Durch die Expression von CD25 besitzen regulatorische T-Zellen eine höhere Affinität zu IL-2 als Effektor-T-Zellen. Tregs benötigen IL-2 zur Aufrechterhaltung ihrer regulatorischen Funktion und scheinen daher mit Effektor-T-Zellen um das inflammatorische Interleukin zu konkurrieren. Somit hemmen sie die IL-2 abhängige Proliferation und Differenzierung aktivierter T-Zellen (Barthlott *et al*, 2005).

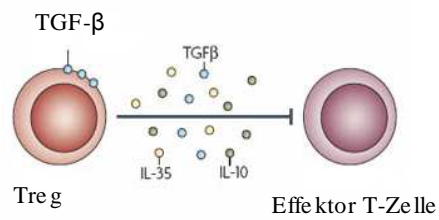
In Versuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen APCs und T-Effektorzellen auch direkt abtöten können. Sie nutzen hierzu Perforin und Granzym-B abhängige Signalwege (Gondek *et al*, 2005). So scheinen neben den T-Zellen auch Antigen präsentierende Zellen Zielstrukturen regulatorischer T-Zellen zu sein.

Deaglio und Kollegen (Deaglio *et al*, 2007) beschreiben als weiteren möglichen Mechanismus eine Hemmung der T-Zell-Funktion durch Adenosin. Sie zeigten, dass die Coexpression von CD39 und CD73 auf regulatorischen T-Zellen zu einer perizellulären Anreicherung von Adenosin führt, welches über den Typ 1 purinogenen Adenosin Rezeptor A2A der T-Zellen die T-Zell-Antwort hemmt.

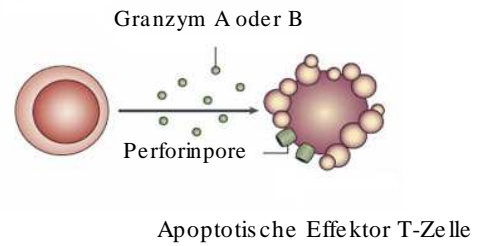
Im Mausmodell induzieren regulatorische T-Zellen - über die Bindung des Oberflächenmoleküls CTLA4 an seine Rezeptoren CD80 und CD86 auf APCs - die Expression des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (Mellor & Munn, 2004). IDO induziert den Katabolismus von Tryptophan zu proapoptotischen Metaboliten, die zu einer T-Zell Suppression führen (Fallarino *et al*, 2003). Da IDO⁺ APCs in humanen Tumoren vorkommen (Mellor & Munn, 2004), ist es möglich, dass dieser Mechanismus im Menschen zur Unterdrückung einer tumorspezifischen Immunantwort führt. Des Weiteren wurde eine Induktion der Expression des Proteins B7-H4 auf Antigen

präsentierenden Zellen durch Tregs beschrieben (Kryczek *et al*, 2006). Das Protein B7-H4 hemmt eine T-Zell vermittelte Immunantwort und wurde in Tumor assoziierten Makrophagen, nicht jedoch in normalen Makrophagen gefunden (Kryczek *et al*, 2006; Sica *et al*, 2003; Zang *et al*, 2003). In Abbildung 3 sind die Wirkmechanismen regulatorischer T-Zellen noch mal zusammengefasst dargestellt. Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen in Tumoren wird nachfolgend genauer betrachtet.

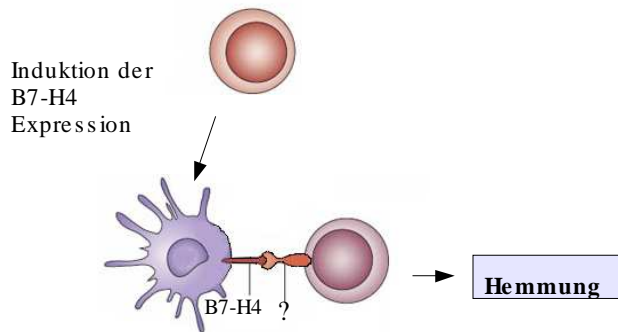
1. Inhibitorische Zytokine



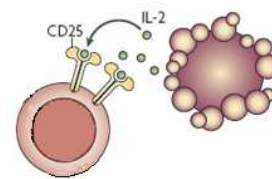
2. Zytolyse



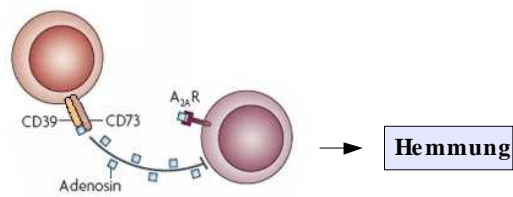
3. B7-H4



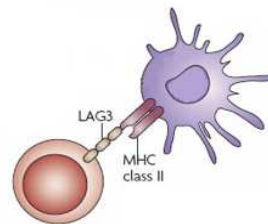
4. Konkurrenz um IL-2



5. Adenosin



6. Hemmung der MHC-Expression



7. IDO

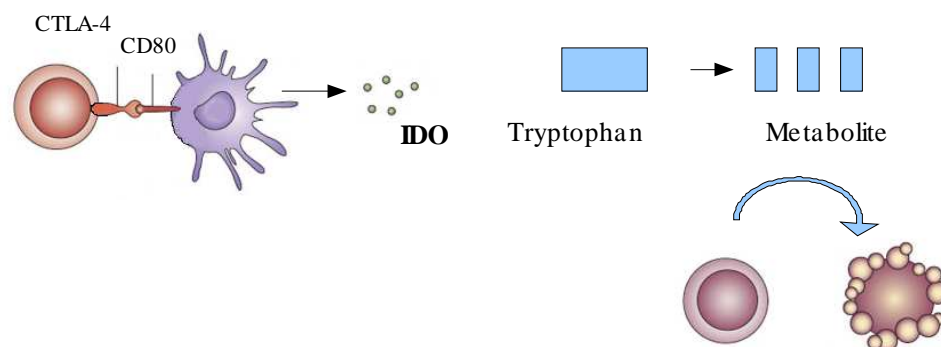


Abbildung 3 Mögliche Wirkungsweisen regulatorischer T-Zellen. Regulatorische T-Zellen können auf verschiedene Weise Effektor T-Zellen in ihrer Funktion hemmen. Auch APC sind Zielstrukturen regulatorischer T-Zellen. Abbildung modifiziert nach Zou sowie Vignali *et al.* (Vignali *et al.*, 2008; Zou, 2006).

Es bleibt eine der großen Herausforderungen der Immunologie, die zahlreichen Mechanismen der Treg vermittelten Immunsuppression weiter zu charakterisieren. Die genaue Kenntnis über die Funktion regulatorischer T-Zellen im menschlichen Organismus ist entscheidend für ein besseres Verständnis des Immunsystems. Hierzu sollte das Verhalten regulatorischer T-Zellen in gesunden Organismen sowie in Krankheitsmodellen genau charakterisiert werden.

1.3.3 Tregs in Tumoren

Da viele Tumorantigene Selbst-Antigene sind, liegt die Vermutung nahe, dass regulatorische T-Zellen durch Toleranzinduktion eine effektive Immunantwort gegen Tumore verhindern können. Am Mausmodell konnten Onizuka und Kollegen 1999 (Onizuka *et al*, 1999) zeigen, dass eine systemische Reduktion von $CD25^+$ T-Zellen (von denen in naiven Mäusen die meisten $CD4^+FOXP3^+$ sind) mittels monoklonaler Antikörper *in vivo* zu einer Unterdrückung verschiedener Tumorzelllinien führte. Zudem wurden in weiteren Versuchen Melanom B16 tragenden Mäusen tumorspezifische $CD8^+$ T-Zellen einmal zusammen mit regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen sowie einmal zusammen mit naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen transferiert. Hierbei war die $CD8^+$ T-Zell vermittelte Immunantwort gegen den Tumor in Mäusen mit regulatorischen T-Zellen vermindert, nicht aber in solchen mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Antony *et al*, 2005; Turk *et al*, 2004). Diese Daten wiesen darauf hin, dass regulatorische T-Zellen in Mäusen die tumorspezifische Immunantwort hemmen können. Diese Erkenntnisse warfen nun die Frage auf, ob eine Treg vermittelte Immunsuppression auch im Menschen eine mögliche Erklärung für das Versagen einer tumorspezifischen Immunreaktion bietet.

Tatsächlich wurde eine erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen in zahlreichen Tumoren beobachtet (Bronchial-Ca (Woo *et al*, 2001), Ovarial-Ca (Woo *et al*, 2001), Mamma-Ca (Liyanage *et al*, 2002), Oesophagus-Ca (Ichihara *et al*, 2003), Magen-Ca, Kolon-Ca (Somasundaram *et al*, 2002), hepatozelluläres Ca (Ormandy *et al*, 2005), Pankreas-Ca (Liyanage *et al*, 2002), Nierenzellkarzinom (Griffiths *et al*, 2007; Jeron *et al*, 2009), Leukämie, Lymphome (Karube *et al*, 2004), Melanom (Viguier *et al*, 2004). Woo *et al*. zeigten in einer Studie mit Patienten, die an Lungenkarzinom oder Ovarialkarzinom litten, erstmals, dass $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in Tumorpatienten erhöht sind und *in vitro* suppressive Funktion ausüben (Woo *et al*, 2001). Große Vorkommen

an Tregs im Ovarialkarzinom gingen in einer Studie von Curiel *et al.* (Curiel *et al.*, 2004) mit reduziertem Überleben der Patientinnen einher. So könnte die Treg-vermittelte Immunsuppression ein wesentlicher Mechanismus von Tumoren sein, dem Immunsystem zu entkommen. Dies stellt ein entscheidendes Hindernis für eine effektive Immuntherapie dar.

Curiel *et al.* (Curiel *et al.*, 2004) untersuchten humane regulatorische T-Zellen in Patientinnen mit unbehandeltem Ovarialkarzinom. Sie fanden unter den Tumor infiltrierenden $CD4^+$ T-Zellen zu etwa 23 % $CD4^+CD25^+$ T-Zellen. Diese Zellen zeigten einen für regulatorische T-Zellen charakteristischen Phänotyp (Expression von FOXP3, GITR, CTLA4, CCR7). Der Anteil an regulatorischen T-Zellen war größer in fortgeschrittenem Tumorstadium. Im Ovar gesunder Patientinnen konnten keine regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem wurden regulatorische T-Zellen in malignem Aszites der Patientinnen beschrieben. Sie kamen hier signifikant häufiger vor als im Blut der Patientinnen. Diese Studie zeigt also eine Akkumulation von regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in Tumorgewebe sowie malignem Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Die regulatorische Funktion der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurde *in vitro* nachgewiesen. $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus dem Tumorgewebe sowie aus malignem Aszites konnten signifikant die Proliferation sowie die zytotoxische Aktivität der aus dem malignen Aszites gewonnenen aktivierten T-Zellen hemmen. Sie hemmten außerdem die Produktion von IL-2 und INF- γ durch aktivierte T-Zellen. Die Tumor infiltrierenden regulatorischen T-Zellen hatten gleiche suppressive Funktion wie aus dem Blut isolierte regulatorische T-Zellen.

Auch Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2004), die $CD4^+CD25^+FOXP3^+GITR^+$ T-Zellen von Patienten mit Melanom isolierten, konnten zeigen, dass humane regulatorische T-Zellen die Proliferation von aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen hemmen. Hierbei erkannte ein Klon von Melanom infiltrierenden regulatorischen T-Zellen das Tumor assoziierte Antigen (TAA) LAGE-1. Dies konnte eine Spezifität regulatorischer T-Zellen für Tumor-Antigene zeigen. Unreife dendritische Zellen, die TAA präsentieren, könnten spezifische Tregs induzieren (Dhodapkar *et al.*, 2001). Ob neben der Differenzierung, Expansion und Aktivierung regulatorischer T-Zellen auch deren Suppression Antigen spezifisch ist oder ob einmal aktivierte Tregs ihre Funktion Antigen unspezifisch ausüben, wird derzeit noch kontrovers diskutiert.

Welche Mechanismen führen nun zu einer Akkumulation regulatorischer T-Zellen in Tumorgewebe?

Sowohl natürliche regulatorische T-Zellen als auch induzierte Tregs wurden in der Umgebung von Tumoren gefunden. Verschiedene Mechanismen, die zu einer Akkumulation regulatorischer T-Zellen in der Tumorumgebung beitragen, werden diskutiert.

So beobachteten Curiel *et al.* (Curiel *et al.*, 2004), dass natürliche Tregs unter Einfluss des Chemokin-Liganden CCL22 (Chemokin (C-C Motiv) Ligand 22) in die Tumorumgebung einwandern. Das auf T-regulatorischen Zellen exprimierte Oberflächenmolekül CCR4 (Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor 4) bindet den von Tumorzellen sowie Makrophagen im Tumormilieu produzierten Liganden CCL22. So wird die Infiltration von regulatorischen T-Zellen in die Tumorumgebung stimuliert. Des Weiteren bewirkt das im Tumormilieu reichlich vorhandene Zytokin TGF- β eine Konversion naiver $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (Chen *et al.*, 2003; Fantini *et al.*, 2004). Interleukin-10, welches ebenfalls vermehrt in der Umgebung von Tumoren vorkommt, induziert die IL-10 produzierenden regulatorischen Tr1-Zellen (Groux *et al.*, 1997). Auch Antigen präsentierende Zellen scheinen in der Rekrutierung regulatorischer T-Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Verschiedene Moleküle aus der Tumorumgebung, wie der Wachstumsfaktor VEGF, das Interleukin-10 sowie das Zytokin TGF- β , führen durch Inhibition der Differenzierung dendritischer Zellen zur Bildung unreifer dendritischer Zellen (Gabrilovich, 2004; Zou *et al.*, 2005). Diese dysfunktionalen dendritischen Zellen induzierten in Tumorpatienten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Interleukin-10 produzierende regulatorische T-Zellen (Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000). Zudem scheinen Tumor assoziierte unreife dendritische Zellen die Expansion natürlicher regulatorischer T-Zellen zu stimulieren (Ghiringhelli *et al.*, 2005b).

Diese Mechanismen zeigen, dass Tumore eine tumorspezifische Immunreaktion aktiv verhindern, indem sie Induktion, Differenzierung und Infiltration von regulatorischen T-Zellen fördern.

1.3.4 Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Therapie

Bislang zielt die Immuntherapie maligner Erkrankungen vor allem darauf ab, die Immunantwort durch Supplementierung aktiver Immunmodulatoren, wie dendritischen Zellen, Zytokinen und tumorspezifischen T-Zellen, zu verbessern. Das Verständnis immunsuppressiver Vorgänge in Tumoren und der Bedeutung regulatorischer T-Zellen hat zu neuen Ansätzen in der immunologischen Krebstherapie geführt. Die Annahme, bisherige Protokolle könnten regulatorische T-Zellen sogar begünstigen (Zhou *et al*, 2006), führte zu einer kritischen Reevaluation der Immuntherapie. So führte eine IL-2 Behandlung in Patienten mit Melanom sowie Patienten mit Nierenzellkarzinom zu erhöhten Zahlen peripherer regulatorischer T-Zellen (Ahmadzadeh & Rosenberg, 2006). IL-2 begünstigte eine vermehrte Expression von CCR4 auf regulatorischen T-Zellen und förderte somit die Migration der Zellen in die CCL22 reiche Tumorumgebung (Curiel *et al*, 2004; Zou *et al*, 2004). Aus Experimenten an Mäusen weiß man, dass IL-2 die Differenzierung, Expansion sowie die Aufrechterhaltung der suppressiven Aktivität von Tregs begünstigt (Furtado *et al*, 2002; Malek & Bayer, 2004). Die Immuntherapie von Tumoren mit IL-2 ist daher aus dieser Sicht eher kritisch zu beurteilen. Ebenso könnte die Therapie mit dendritischen Zellen, transfiziert mit bestimmten Tumorantigenen, anders als erwünscht nicht die TAA-spezifische Immunantwort fördern, sondern spezifische regulatorische T-Zellen stimulieren (Lundqvist *et al*, 2005; Yamazaki *et al*, 2003). Denn eine Spezifität regulatorischer T-Zellen für TAA konnte in einer Studie von Wang und Kollegen (Wang *et al*, 2004) bereits nachgewiesen werden.

Neue Ansätze in der Krebstherapie versuchen daher, die Immunsuppression zu unterdrücken, um die Effektivität einer tumorspezifischen Immunreaktion zu verbessern. Studien, die suppressive Moleküle und regulatorische T-Zellen als Zielstrukturen in den Fokus rücken, eröffnen neue Möglichkeiten für eine effektive Tumor Immuntherapie.

Danull *et al*. zeigten in einer Studie, dass die Reduktion regulatorischer T-Zellen die Immunantwort in Tumorpatienten verbessern konnte (Dannull *et al*, 2005). Sie behandelten Patienten mit Nierenzellkarzinom mit einer einmaligen Dosis des Ligand-Toxin Fusionsproteins Denileukin diftitox (Ontak). Ontak besteht aus Interleukin-2 sowie aus den enzymatisch aktiven und translozierenden Domänen des Diphtherietoxins. Aufgrund der hohen Affinität von IL-2 zu seinem Rezeptor CD25, wird das Protein

über Endozytose in regulatorische CD25⁺ T-Zellen aufgenommen und führt dort zu Apoptose. Regulatorische T-Zellen exprimieren große Mengen der Interleukin-2-Rezeptor-Kette- α (CD25) (Baecher-Allan *et al*, 2001). Nicht regulatorische T-Zellen, die CD25 in mittleren oder geringen Mengen aufweisen, wurden in der angewandten Dosierung durch das Toxin nicht beeinflusst. Regulatorische T-Zellen konnten somit spezifisch dezimiert werden. Nach vier Tagen erhielten die Patienten eine Impfung mit dendritischen Zellen, die mit Tumor-RNA transfiziert waren, um eine TAA-spezifische Immunantwort zu stimulieren. Im Vergleich zu Patienten, die die Impfung allein erhielten, zeigten die Patienten mit reduzierten regulatorischen Zellen eine verbesserte Stimulation von tumorspezifischen Effektorzellen. Danull *et al.* demonstrierten damit, dass die Eliminierung peripherer regulatorischer T-Zellen *in vivo*, die tumorspezifische Immunantwort - vermittelt durch eine Impfung mit Tumor-RNA transfizierten dendritischen Zellen - verbessern kann.

Andere Strategien, die Treg vermittelte Immunsuppression zu unterdrücken, könnten die Tumordinfiltration regulatorischer T-Zellen, ihre Differenzierung und Funktion adressieren. Im Ovarialkarzinom zeigte eine Blockade des Chemokin-Liganden CCL22 eine verminderte Tumordinfiltration durch regulatorische T-Zellen (Curiel *et al*, 2004). Die Beeinflussung des Migrationsverhaltens regulatorischer T-Zellen stellt somit eine viel versprechende Therapieoption dar. Mit der Differenzierung und Funktion regulatorischer T-Zellen assoziierte Moleküle, wie FOXP3, GITR, IL-2 (Fontenot *et al*, 2003; Malek & Bayer, 2004; Shimizu *et al*, 2002) und andere, könnten weitere wichtige therapeutische Zielstrukturen sein. Die spezifische Manipulation regulatorischer T-Zellen bietet neue therapeutische Möglichkeiten und verdient weiterhin die Aufmerksamkeit intensiver Forschung.

1.4 Zielsetzung

Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen für das Immunsystem des menschlichen Organismus wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Viele neue Erkenntnisse über den Einfluss regulatorischer T-Zellen in der Tumorbilogie konnten erzielt werden und haben zu neuen Ansätzen in der immunologischen Krebstherapie geführt.

Das Nierenzellkarzinom ist eine Tumorentität, die sehr schlecht auf zytostatische und radiologische Behandlung anspricht. Immuntherapien konnten hier zum Teil bessere Ergebnisse erzielen. Neue Therapieansätze, die regulatorische T-Zellen als Zielstrukturen in den Fokus rücken, eröffnen neue Möglichkeiten für eine effektive Tumor Immuntherapie. Danull *et al.* zeigten in einer Studie, dass die Reduktion regulatorischer T-Zellen die Immunantwort in Patienten mit Nierenzellkarzinom verbessern konnte. Um die bestehenden therapeutischen Ansätze weiter zu entwickeln, ist ein genaues Verständnis immunologischer Vorgänge im Nierenzellkarzinom daher essenziell.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, regulatorische T-Zellen im Nierenzellkarzinom zu untersuchen. FOXP3 gilt bislang als spezifischster Marker regulatorischer T-Zellen. Es sollte daher zum einen die Genexpression von FOXP3 auf molekularer Ebene, zum anderen dessen Expression auf Proteinebene untersucht werden. Dabei sollte die Expression im Vergleich zu normalem Nierengewebe des gleichen Patienten betrachtet und quantifiziert werden. Um FOXP3 positive Zellen genauer charakterisieren zu können, sollten diese außerdem auf das Oberflächenantigen CD4 untersucht werden.

Hierzu sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Gewinnung von primärem Nierenzellkarzinom-Material sowie angrenzendem normalen Nierengewebe im Rahmen einer radikalen Tumornephrektomie. Konservierung der *in vivo*-Genexpression durch spezielle RNA-Stabilisierung sowie Fixierung von Gewebe in Formaldehyd.
- Etablierung einer geeigneten Färbemethode zum immunhistochemischen Nachweis von FOXP3 im Nierenzellkarzinom sowie angrenzendem normalen Nierengewebe.
- Immunhistochemischer Nachweis von FOXP3 im Nierenzellkarzinom sowie angrenzendem normalen Nierengewebe an Gewebeproben von 32 Patienten mit Hilfe dieser neu etablierten immunhistochemischen Färbemethode.
- Untersuchung der Expression von FOXP3 im Nierenzellkarzinom und angrenzendem Normalgewebe von 32 Patienten mittels konventioneller und quantitativer *real time* RT-PCR.
- Etablierung einer Färbemethode zum immunhistochemischen Nachweis von CD4 sowie Etablierung einer Parallelfärbung beider Antigene.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengut

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben von Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt waren, verwendet. Das Nierengewebe von 32 Patientinnen und Patienten im Alter von 43 bis 84 Jahren wurde untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 65 Jahre. Alle 32 Patienten waren an einem klarzelligen Nierenzellkarzinom erkrankt.

Nach der TNM-Klassifikation der UICC wiesen 21 Patienten einen Primärtumor im Stadium T1 auf, davon 7 Patienten mit Stadium T1a und 13 Patienten mit Stadium T1b. Ein Stadium T2 wurde bei 5 Patienten beschrieben, Stadium T3 bei 7 Patienten (T3a 2 Patienten, T3b 4 Patienten, T3c 1 Patient). Bei 2 Patienten waren Lymphknotenmetastasen vorhanden, 2 Patienten wiesen bereits Fernmetastasen auf.

Die Charakteristika der einzelnen Patienten sind in Tabelle 5 noch einmal zusammengefasst.

Das Gewebe wurde im Zeitraum zwischen 2005 und 2008 im Rahmen der primären Tumornephrektomie am Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Marburg entnommen. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden jeweils Proben aus den Nierenzellkarzinomen sowie aus dem jeweils angrenzenden Normalgewebe des gleichen Organs entnommen. Die Gewebeproben wurden umgehend in RNAlater, eine RNA-stabilisierenden und -konservierenden Lösung aufgenommen.

Die immunhistologischen Färbungen erfolgten an formalinfixiertem und paraffiniertem Nierengewebe. Die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin erfolgte durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Marburg. Als Kontrollgewebe dienten Gewebeproben aus Tonsille und Dünndarm.

Tabelle 5 Patientencharakteristika

Patient	Geschlecht/Alter	Histologischer Subtyp	Tumorstadium und Grading
1	w/80	konventionell	pT3b, pNx, G3
2	m/70	konventionell	pT1a, pNx, G2
4	w/84	konventionell	pT1b, pNx, G2
5	w/66	konventionell	pT1b, pNx, G2
6	w/66	konventionell	pT3a, pN2, G3
7	w/55	konventionell	pT3b, pN0, G2
8	w/76	konventionell	pT1b, pN0, G2
9	m/78	konventionell	pT3b, pNx, G2
10	m/68	konventionell	pT2, pN0, G2
12	m/65	konventionell	pT1b, pNx, G2
13	m/56	konventionell	pT1b, pNx, G2
14	w/76	konventionell	pT1a, pNx, G2
15	m/71	konventionell	pT1b, pN0, G2
16	w/62	konventionell	pT2, pNx, G2
17	w/61	konventionell	pT1a, pNx, G1
18	w/46	konventionell	pT1a, pNx, G2
19	m/78	konventionell	pT3b, pN2, G3
20	m/57	konventionell	pT3a, pNx, G2
21	w/64	konventionell	pT1b, pNx, G1
22	w/77	konventionell	pT1b, pNx, G2
23	m/57	konventionell	pT1b, pN0, G2
24	w/73	konventionell	pT1a, pNx, G2
25	m/53	konventionell	pT3c, pNx, G2
26	m/52	konventionell	pT2, pNx, G2
27	w/67	konventionell	pT1b, pN0, G2
28	m/43	konventionell	pT2, pNx, G2
29	w/46	konventionell	pT1b, pNx, G2
30	m/68	konventionell	pT1b, pN0, G2
31	w/66	konventionell	pT1b, pNx, G2
32	w/70	konventionell	pT1a, pN0, G2

m = männlich, w = weiblich. Histologischer Subtyp gemäß der WHO-Klassifikation 2004 (Eble *et al*, 2004).

2.1.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6 und 7 aufgeführt.

Tabelle 6 Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Brutschrank	Modell 200	Memmert, Schwabach
Computer	HP Compaq dc 7600	Hewlett Packard, München
Drucker	HP Deskjet D-4260	Hewlett Packard, München
	HP Laserjet 2100 TN	Hewlett Packard, München
Elektrophoresekammern	40-1214	Peqlab, Erlangen
Gefriertruhe	KSD 3542	Liebherr, Ochsenhausen
Heizplatte	type 13501	Medax, Neumünster
Homogenisierer	Ultra Turrax - IKA T10 basic	Ika-Werke, Staufen
Kamera	ProgRes C14	Jenoptik, Jena
Kühlschrank	KSD 3542	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	RCT basic	Ika-Werke, Staufen
Mikroskop	Diaplan	Leitz, Wetzlar
	Axiovert 200	Zeiss, Göttingen
Mikrotom	RM 2155	Leica, Solms
Mikrowelle	R-234	Sharp Electronics, Hamburg
PCR Thermocycler	PTC 100	Biozym, Hessisch Oldendorf
	PTC 200	Biozym, Hessisch Oldendorf
pH-Meter	HI 991001	Hanna, Woonsocket - USA
Photokamera	Power-Shot G2	Canon, Tokyo - Japan
Photometer	Gene Ray - UV Photometer	Biometra, Göttingen
Pipetten	1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	accu jet	Brand, Wertheim
qPCR Thermocycler	iQ5 Real-Time PCR Detection System	Bio Rad, Hercules - USA
Schwenker	TPM-2	Sarstedt, Nümbrecht
Software	Windows XP	Microsoft, München
	Microsoft Word 2003	Microsoft, München
	Microsoft Excel 2003	Microsoft, München
	iQ5 2.0 Optical System Software	Bio Rad, Hercules - USA
	Bio Doc Analyze 2.1	Biometra, Göttingen
	Adobe Photoshop 5.0	Adobe Systems, München
Spannungsquelle	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
UV-Transluminator	UV T-20M	Herolab, Wiesloch
Vortexer	MELB 1719	Merck, Darmstadt
Waagen	Sartorius type 1801, 3708	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ 324	Medax, Neumünster
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	Minifuge T	Heraeus, Hanau
	Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 7 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Collection Tubes 1,5 ml, 2,0 ml	Qiagen, Hilden
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Einmalpinzetten	Angiokard, Friedeburg
Einmalpipetten 10 ml	Greiner-bio-one, Solingen
Einmalskalpell	Feather, Osaka - Japan
Filterpapier	Whatman, Dassel
Greinerröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner-bio-one, Solingen
Messer	Feather, Osaka - Japan
Mikrotiterplatten - Multiplate low 48 Wells	Bio Rad, Hercules - USA
Objektträger	Roth, Karlsruhe
PCR-Sealers - Microseal 'B'-Film	Bio Rad, Hercules - USA
PCR-Softstrips 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen 14 ml	Falcon, Heidelberg
SafeSeal Tip Premium 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, 2,5 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Tücher	Kimberly-Clark, Neenah - USA

2.1.3 Chemikalien

In Tabelle 8 sind die verwendeten Chemikalien und Enzyme aufgeführt.

Tabelle 8 Chemikalien und Enzyme

Artikel	Hersteller
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniummolybdat	Roth, Karlsruhe
Ampuva	Apotheke Klinikum Marburg
Antibody Diluent	Dako, Glostrup - Dänemark
bovines Serum (BSA)	Sigma, Steinheim
Citrat	Roth, Karlsruhe
Coral Load PCR Puffer 10x	Qiagen, Hilden
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Qiagen, Hilden
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Steinheim
DNA-Ladder 100 bp	Promega, Madison - USA
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Ethanol (vergällt)	Apotheke Klinikum Marburg

Ethanol absolut	Honeywell - Riedel-de Haën, Seelze
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	Merck, Darmstadt
Gel red	Biotrend, Köln
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Karbolxylol	Roth, Karlsruhe
Loading Die Blue/Orange	Promega, Madison – USA
Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Nukleasefreies Wasser	Promega, Madison – USA
Oligo(dT) 15 Primer	Promega, Madison – USA
PBS	Roth, Karlsruhe
Reverse Transkriptase (Enhanced Avian RT)	Sigma, Steinheim
RNAlater	Qiagen, Hilden
RNase Inhibitor	Promega, Madison – USA
RT Puffer (10x)	Sigma, Steinheim
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
TBE Puffer (10x)	Roth, Karlsruhe
TBS	Sigma, Steinheim
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Antikörper, Seren und immunhistochemische Kits

Zur Detektion von FOXP3⁺ Zellen wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte verwendet. Der Sekundärantikörper wurde im Kaninchen hergestellt. Das Normalserum zum Reduzieren der unspezifischen Hintergrundreaktion stammte ebenfalls aus dem Kaninchen. Die Färbung von CD4⁺ Zellen erfolgte mittels eines monoklonalen Antikörpers aus der Maus. Der Sekundärantikörper wurde im Pferd hergestellt, aus dem auch das Normalserum gewonnen wurde. Die Antikörper und Seren sowie die verwendeten Kits sind in Tabelle 9 und 10 aufgeführt.

Tabelle 9 Antikörper

Reagenz	Katalognummer	Hersteller
Primärantikörper		
anti-human FOXP3 (Ratte)	14-4776	eBioscience, San Diego- USA
anti-human CD4 (Maus)	VP-C318	Vector, Wertheim-Bettingen
Sekundärantikörper		
Rabbit-anti-Rat IgG (Kaninchen)	BA-4000	Vector, Wertheim-Bettingen
Horse-anti-Mouse IgG (Pferd)	BA-2000	Vector, Wertheim-Bettingen

Tabelle 10 Normalseren und Kits

Reagenz	Katalognummer	Hersteller
Normalserum		
Normal-Rabbit-Serum	S-5000	Vector, Wertheim-Bettingen
Normal-Horse-Serum	S-2000	Vector, Wertheim-Bettingen
Kits		
Avidin/Biotin-Blocking Kit	SP-2001	Vector, Wertheim-Bettingen
ABC-Kit	PK-4002	Vector, Wertheim-Bettingen

2.1.5 Molekularbiologische Kits

Die verwendeten molekularbiologischen Kits sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11 Molekularbiologische Kits

Funktion	Name	Katalognummer	Hersteller
RNA Extraktion	RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen, Hilden
DNAse Verdau	RNase Free DNase Set	79254	Qiagen, Hilden
qualitative PCR	SYBR-Green QuantiTect PCR Kit	204143	Qiagen, Hilden

2.1.6 Primer

Es wurden zwei Primer für die Amplifikation der beiden *Housekeeping* Gene RPS9 (Ribosomal Protein S9) und HPRT1R (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1) verwendet sowie ein Primer zur Detektion des Zielgens FOXP3. Die Primer sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 12 Verwendete Primer zur Amplifikation der Housekeeping Gene (RPS9, HPRT1R)

Gen	Sequenz	Produktgröße	Firma
RPS9 (sense)	5'-TGT CGC AAA ACT TAT GTG ACC C-3'	109 bp	Eurofins mwg operon, Ebersberg
RPS9 (antisense)	5'-TCC AGA CCT CAC GTT TGT TCC-3'		
HPRT1R (sense)	5'- GAT CCA TTC CTA TGA CTG TAG-3'	274 bp	Eurofins mwg operon, Ebersberg
HPRT1R (antisense)	5'-TCA AAT CCA ACA AAG TCT GGC-3'		

Tabelle 13 Verwendeter Primer zur Amplifikation des Zielgens FOXP3

Gen	Sequenz	Name	Katalognummer
FOXP3 (sense + antisense)	vertraulich	QuantiTect Primer Assays	QT00048286

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemische Methoden

Die immunhistologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden an humanem Nierengewebe vorgenommen. Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden zunächst 4-8 µm dicke Schnitte erstellt. Zur Auswahl der Gewebeschnitte für die immunhistochemischen Färbungen erfolgten Übersichtsfärbungen mit Hämalaun und Eosin. Es wurde ein immunhistochemisches Färbeprotokoll zum Nachweis des Transkriptionsfaktors FOXP3 etabliert. Gewebeproben von ausgewählten Fällen einer Patientenreihe wurden nach dem etablierten Protokoll untersucht. Es folgte anschließend die Etablierung eines Färbeprotokolls zum Nachweis des Oberflächenmarkers CD4 sowie die Etablierung einer Parallelfärbung der beiden Marker.

2.2.1.1 Auswahl und Erstellung der Paraffinschnitte

Für die immunhistochemische Färbung wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben mithilfe eines Rotationsmikrotoms geschnitten. Zum Strecken wurden die Schnitte in ein 40 °C temperiertes Wasserbad gegeben und anschließend auf silanisierte Objektträger (OT) aufgezogen. Dann wurden sie für etwa eine Stunde auf einer Heizplatte getrocknet. Die Schnitte konnten so bei Raumtemperatur bis zur Färbung aufbewahrt werden.

Es wurden 8 µm dicke Schnitte von Nierengewebe, Tonsille und Dünndarm für die Etablierung des Färbeprotokolls von FOXP3 gefertigt sowie 4 µm dicke Schnitte zur Etablierung einer Parallelfärbung von FOXP3 und CD4. Von den ausgewählten Fällen der Patientenreihe lagen jeweils mehrere Paraffinblöcke mit Nierengewebe vor, sodass zunächst eine Auswahl der Proben erfolgte. Hierzu wurde von drei Gewebeproben eines jeden Patienten ein Schnitt gefertigt und dieser zur Übersicht einer HE-Färbung unterzogen. Anhand der Übersicht wurde von jedem Fall eine Gewebeprobe für die immunhistochemische Färbung ausgewählt. Hierbei war entscheidend, dass der Grenzverlauf zwischen gesundem Nierengewebe und dem Nierenzellkarzinom auf dem histologischen Schnitt zu sehen war. Es wurden von jedem Fall der Patientenreihe 15 Schnitte in 4 µm Dicke erstellt.

2.2.1.2 Die HE-Färbung als Übersichtsfärbung

Die Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung dient als Übersichtsfärbung, die eine Differenzierung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild ermöglicht. Während Hämalan basophile Strukturen, insbesondere die Zellkerne, blau färbt, färbt Eosin azidophile Strukturen, wie zum Beispiel die Zellplasmae, rot (Welsch, 2006).

Für die Übersichtsfärbung mit Hämalan und Eosin wurden die Gewebeschnitte der Patientenreihe zunächst in Xylol drei mal 5 Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) rehydriert. Die Schnitte wurden dann 10 Minuten in Hämalan gefärbt und anschließend über weitere 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach kurzem Abspülen mit Aqua bidest wurden die Präparate jetzt für 30 Sekunden mit Eosin gefärbt und anschließend in 70 %igem Ethanol gespült. Es folgte die Inkubation in 96 %igem Ethanol für 5 Minuten sowie für weitere 5 Minuten in 100 %igem Ethanol. Nach kurzem Abspülen mit Karbolxylol wurden die Schnitte für weitere 10 Minuten in Xylol gegeben und schließlich mit Entellan eingedeckt.

2.2.1.3 Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der Proteine und andere Strukturen (Antigene) mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Sie beruht auf der Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Antigen. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein und somit das Vorhandensein des Antigens im Präparat nachweist (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000). Während polyklonale Antikörper von mehreren Zellklonen produziert werden und mit verschiedenen Antigen determinanten (Epitopen) eines Antigens reagieren, zeichnen sich die auch in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper durch eine hohe Spezifität aus. Sie werden von nur einem Zellklon gebildet und sind folglich gegen ein einziges Epitop gerichtet. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei monoklonale Antikörper zum Einsatz: Der Antikörper gegen humanes FOXP3 der Firma eBioscience richtet sich gegen den im Zellkern lokalisierten Transkriptionsfaktor FOXP3. Er wurde in der Ratte hergestellt. Der in der Maus produzierte Antikörper gegen humanes CD4 detektiert den Oberflächenmarker CD4 in der Zellmembran.

Der immunhistochemische Nachweis eines Antigens kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Methode reagiert ein enzymmarkierter Primärantikörper mit dem nachzuweisenden Gewebean antigen. Nach Zugabe eines Substrates, welches das Enzym unter Bildung eines Farbstoffes umsetzt, wird die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000).

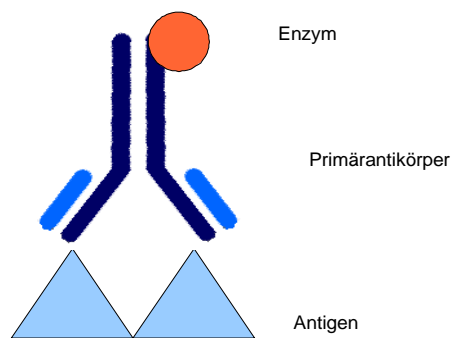


Abbildung 4 Direkte Methode der Immunhistochemie. Ein enzymmarkierter (orange) Primärantikörper (blau) reagiert mit einem Gewebean antigen (hellblau). In einer Enzym-Substrat-Reaktion wird nach Zugabe eines Chromogens die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar. Abbildung modifiziert nach Herstellerangaben (Boenisch *et al*, 2003).

Bei der indirekten Methode wird neben dem Primärantikörper, der sich gegen das zu untersuchende Antigen richtet, ein weiterer Antikörper auf das Gewebe aufgebracht. Der Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einem Enzym konjugiert. Dieses löst die Farbreaktion in einer Enzym-Substrat-Reaktion aus und macht somit die Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar. Die indirekte Methode ermöglicht durch eine Signalverstärkung den Nachweis bereits sehr geringer Mengen an Epitop.

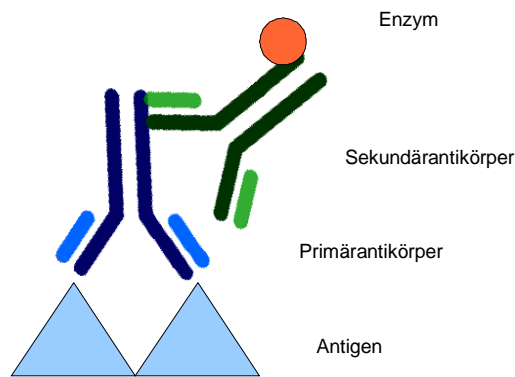


Abbildung 5 Indirekte Methode der Immunhistochemie. Ein enzymmarkierter (orange) Sekundärantikörper (grün) bindet spezifisch an einen Primärantikörper (blau), der mit einem Gewebeantigen (hellblau) reagiert. In einer Enzym-Substrat-Reaktion wird nach Zugabe eines Chromogens die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar. Abbildung modifiziert nach Herstellerangaben (Boenisch *et al*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die ABC-Methode nach Hsu (Hsu *et al*, 1981), eine indirekte Färbemethode, angewandt. In einem Dreischrittverfahren kommen ein Primärantikörper, ein mit Biotin markierter Sekundärantikörper und ein Komplex aus biotinyliertem Enzym und Avidin (ABC-Komplex) zum Einsatz. Dabei wird das Enzym, das nach Oxidation eines Chromogens die Farbreaktion auslöst, über mehrere Schritte indirekt an das nachzuweisende Antigen gebunden. Die Methode basiert auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin zu dem Vitamin und Koenzym Biotin (Noll & Schaub-Kuhnen, 2000). Avidin, ein Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Aufgrund der mehrfachen Bindungsstellen kann Avidin sowohl das biotinylierte Enzym, als auch den biotinylierten Sekundärantikörper binden und ermöglicht somit die indirekte Kopplung des Enzyms an das nachzuweisende Antigen. Die vielen Biotinbindungsstellen des Avidins sowie der mehrfach biotinylierte Sekundärantikörper führen zu einer deutlichen Signalverstärkung der Antigen-Antikörperreaktion.

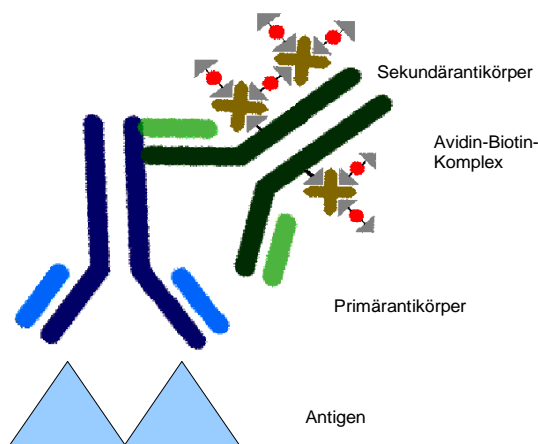


Abbildung 6 ABC-Methode. Ein mit Biotin (grau) markierter Sekundärantikörper (grün) bindet spezifisch an den Primärantikörper (blau), der mit dem nachzuweisenden Gewebeantigen (hellblau) reagiert. Der ABC-Komplex, ein Komplex aus biotinyliertem Enzym (rot) und Avidin (braun), bindet an das Biotin des markierten Sekundärantikörpers. In einer Enzym-Substrat-Reaktion wird nach Zugabe eines Chromogens die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar. Abbildung modifiziert nach Herstellerangaben (Boenisch *et al*, 2003).

Als Primärantikörper kamen in der vorliegenden Arbeit zwei monoklonale Antikörper zum Einsatz. Ein Antikörper richtete sich gegen den Transkriptionsfaktor FOXP3. Ein zweiter Antikörper detektierte den Oberflächenmarker CD4. Nach dem Primärantikörper wurde ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper auf das Gewebe gegeben. Der dann hinzugegebene ABC-Komplex koppelte das Enzym Peroxidase über den Sekundärantikörper indirekt an das Antigen. Die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung wurde nach Zugabe des Substrates DAB (Diaminobenzidin), welches in einer enzymatischen Reaktion zu einem unlöslichen Farbstoff oxidiert wird, sichtbar.

Reihenfolge der eingesetzten Reagenzien:

Primärantikörper
 +
Sekundärantikörper
 +
ABC-Komplex
 +
DAB

2.2.1.4 Immunhistochemie am Paraffinschnitt

Nach dem Prinzip der ABC-Methode wurde ein Färbeprotokoll zum Nachweis des nukleären Transkriptionsfaktors FOXP3 sowie ein Protokoll zum Nachweis des Oberflächenmarkers CD4 etabliert. Für die Parallelfärbung wurde das ursprüngliche FOXP3-Protokoll an das Färbeprotokoll von CD4 angepasst.

FOXP3-Färbung

Für den immunhistochemischen Nachweis FOXP3⁺ Zellen wurden die vorgefertigten Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. In einer Vorbehandlung wurden die Proben in einem Citratbad in der Mikrowelle erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte eine Inkubation in Ammoniumchlorid sowie eine weitere Inkubation in Wasserstoffperoxid. Im Anschluss wurde ein Normalserum aus dem Kaninchen aufgetragen und über eine Stunde inkubiert. Dieser Schritt erfolgte in einer Feuchtkammer, um die Schnitte vor dem Austrocknen zu bewahren. Als nächstes wurde die Blockade von Avidin und Biotin durchgeführt, wonach der Primärantikörper gegen humanes FOXP3 aufgetragen wurde. Die Antikörperverdünnung betrug während der Etablierung des Protokolls 1:300 und wurde später auf die klinische Studie angepasst. Die Fälle der Patientenreihe wurden mit einer Antikörperverdünnung von 1:150 behandelt. Der Antikörper inkubierte in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht. Zwischen jedem der genannten Schritte wurde ein Waschschrift mit PBS durchgeführt.

Am nächsten Tag erfolgte nach einem Waschschrift die Inkubation des Sekundärantikörpers. Danach wurden die Proben über eine Stunde mit der ABC-Lösung inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Antigen-Antikörper-Bindung wurden die Proben dann mit dem Chromogen DAB und 3 %igem Wasserstoffperoxid behandelt. Die Reaktion wurde durch das Waschen der Schnitte in kaltem Tris/HCl und Aqua bidest gestoppt. Auch hier wurde zwischen jedem der genannten Schritte ein Waschschrift mit PBS durchgeführt. Nach der Gegenfärbung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert, in Xylol gewaschen und schließlich mit Entellan eingedeckt. Abbildung 7 zeigt die Arbeitsschritte des Färbeprotokolls noch einmal zusammengefasst. Ein detailliertes Protokoll ist dieser Arbeit beigelegt.

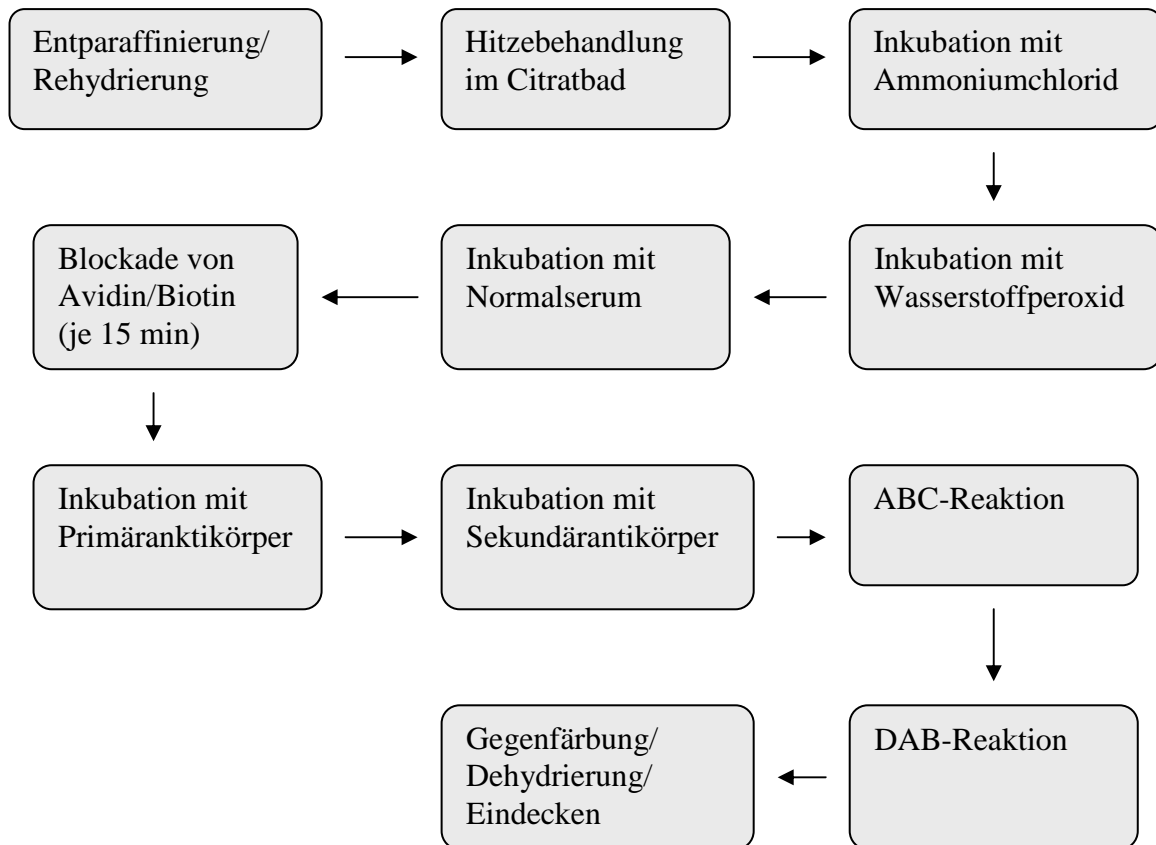


Abbildung 7 Arbeitsschritte des Färbeprotokolls zum immunhistochemischen Nachweis des Transkriptionsfaktors FOXP3 in der Niere.

Gegenfärbung

Um die Präparate histologisch besser beurteilen zu können, wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne durchgeführt. Während der Etablierung des Protokolls erfolgte die Gegenfärbung der Proben mit Methylenblau. Hierzu wurden die OT 60 Minuten lang bei 45 °C mit 1 %igem Methylenblau gefärbt. Nach kurzem Schwenken der Schnitte in Aqua bidest folgte eine 30 minütige Fixierung in 5 %igem Ammoniummolybdat. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten in Aqua bidest gewaschen.

Die Gewebeschnitte der Patientenreihe wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Dabei wurden die OT 15 Sekunden in Hämalaun getaucht und anschließend über 5 Minuten unter lauwarmem fließendem Leitungswasser gebläut.

CD4-Färbung

Auch für die CD4-Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Es folgte direkt im Anschluss eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Danach wurden die Proben in 1 mM EDTA in der Mikrowelle erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Während des Erhitzens verdunstetes EDTA wurde gegebenenfalls nachgefüllt. Die Gewebeproben wurden dann in Ammoniumchlorid inkubiert. Im nächsten Schritt wurde ein Normalserum aus dem Pferd aufgetragen und in einer Feuchtkammer über vier Stunden inkubiert. Es folgte die Blockade von Avidin und Biotin mit der entsprechenden Blockierlösung des Avidin/Biotin Blocking Kits. Jetzt wurde der Primärantikörper gegen humanes CD4 in einer Verdünnung von 1:300 aufgetragen. Die Proben inkubierten in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht. Zwischen jedem der genannten Schritte wurde ein Waschvorgang mit PBS durchgeführt.

Am zweiten Tag erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers. Danach wurden die Proben über eine Stunde mit der ABC-Lösung inkubiert. Analog zum FOXP3 Protokoll wurden die Proben dann zum Sichtbarmachen der Antigen-Antikörper-Bindung mit dem Chromogen DAB und 3 %igem Wasserstoffperoxid behandelt. Die Reaktion wurde durch das Waschen der Schnitte in kaltem Tris/HCl und Aqua bidest gestoppt. Zwischen jedem der genannten Schritte erfolgte ein Waschvorgang mit PBS. Nach der Gegenfärbung wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert, in Xylol gewaschen und mit Entellan eingedeckt.

Parallelfärbung

Für die Parallelfärbung von FOXP3 und CD4 wurden zwei aus dem gleichen Gewebe direkt hintereinander liegende Gewebeschnitte nebeneinander auf einen OT aufgebracht. An beiden Schnitten wurde dann parallel das Färbeprotokoll durchgeführt, wobei der eine Schnitt mit dem Primärantikörper gegen humanes FOXP3, der andere mit dem Primärantikörper gegen humanes CD4 behandelt wurde.

Für die Parallelfärbung wurde das ursprüngliche FOXP3 Protokoll an das Protokoll der CD4 Färbung angepasst. Diese Anpassung beinhaltete die Umstellung der Hitzebehandlung mit Citrat auf eine Hitzebehandlung mit EDTA. Außerdem erfolgte die Inkubation mit Wasserstoffperoxid nicht wie im ursprünglichen FOXP3 Protokoll nach der Hitzebehandlung, sondern wurde als erster Schritt nach der Entparaffinierung

und Rehydrierung vorgenommen. Des Weiteren wurde die Blockade von Avidin und Biotin von ursprünglich 15 Minuten auf jeweils 90 Minuten verlängert. Für genauere Angaben siehe beigefügtes Protokoll.

In Abbildung 8 sind die Arbeitsschritte des Färbeprotokolls der Parallelfärbung dargestellt.

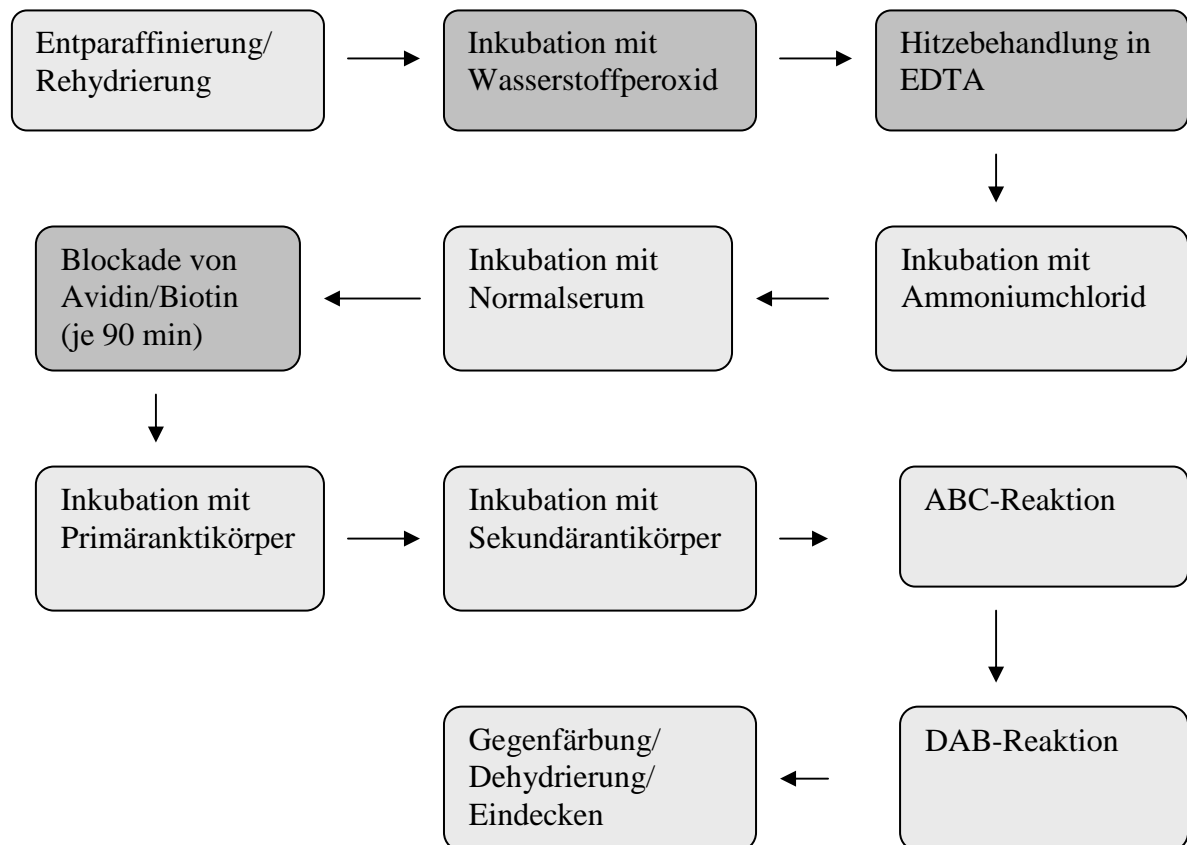


Abbildung 8 Arbeitsschritte des Färbeprotokolls zur immunhistochemischen Parallelfärbung der beiden Marker FOXP3 und CD4 an Paraffinschnitten. Die Unterschiede zum ursprünglichen FOXP3-Protokoll sind grau hervorgehoben.

Kontrollen

Zum Überprüfen der Färbungen wurden bei jeder Färbung positive sowie negative Kontrollen mitgeführt. Als positive Kontrolle diente Gewebe aus Dünndarm und Tonsille, das reichlich lymphatische Zellen aufweist. Zur Beurteilung der einzelnen Teilreaktionen der Färbungen wurden verschiedene Negativkontrollen auf humanem Nierengewebe eingesetzt, bei denen einzelne Komponenten des Färbeprotokolls ausgelassen wurden. In vier Negativkontrollen wurde einmal der Primärantikörper,

einmal der Sekundärantikörper, einmal Primär- und Sekundärantikörper und einmal beide Antikörper und der ABC-Komplex weggelassen.

1. Negativkontrolle: ohne Sekundärantikörper (1. AK + ABC + DAB)
2. Negativkontrolle: ohne Primärantikörper (2. AK + ABC + DAB)
3. Negativkontrolle: nur ABC-Komplex und DAB
4. Negativkontrolle: nur DAB

2.2.1.5 Auswertung der Immunhistochemie

Die histologischen Präparate wurden nach der Färbung mikroskopisch ausgewertet. Während der Etablierung der Protokolle wurden die gefärbten Präparate hinsichtlich der Qualität der Färbung beurteilt. Hierbei wurden beispielsweise Aussagen über die Spezifität der Färbung, das Ausmaß an Hintergrundreaktionen und den Kontrast getroffen.

Die ausgewählten Fälle der Patientenreihe wurden einer semi-quantitativen Auswertung unterzogen. Es wurden vier Bereiche definiert, für die in jedem Präparat die mittlere Zellzahl positiv gefärbter Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt wurde. Dabei wurden für jeden der vier Bereiche Gesichtsfelder ausgezählt und ein fortlaufender Mittelwert der positiven Zellen in einem Gesichtsfeld (a, b, c,...) gebildet (Formel: $(a+b):2$, $(a+b+c):3$, $(a+b+c+d):4$, ...). Es wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt, bis die Schwankung des fortlaufenden Mittelwertes der positiven Zellen weniger als 10 % betrug. Neben den beiden Bereichen *Normalgewebe* und *Tumorgewebe* wurden zwei Bereiche in der Grenzregion zwischen Tumor- und Normalgewebe definiert. Eine Unterteilung der Region in ein *Randgebiet im Normalgewebe* (RN) und ein *Randgebiet im Tumorgewebe* (RT) erwies sich als sinnvoll. Das Randgebiet wurde dabei definiert als das erste Gesichtsfeld in 40-facher Vergrößerung jenseits der Grenze zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe, sodass die Breite des Randgebiets sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe genau der Breite eines Gesichtsfeldes entsprach. Somit wurde für jeden Patienten die durchschnittliche Zellzahl pro Gesichtsfeld für die Bereiche Tumorgewebe (T), Normalgewebe (N), Randgebiet im Tumorgewebe (RT) und Randgebiet im Normalgewebe (RN) ermittelt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde RNA aus Nierengewebe isoliert, in cDNA umgeschrieben und schließlich mittels PCR amplifiziert. Es wurde ein Primer eingesetzt, der spezifisch das FOXP3 Gen amplifiziert. Von jedem Fall der Patientenreihe wurde die Genexpression von FOXP3 im normalen Nierengewebe sowie im Nierenzellkarzinomgewebe untersucht. Zum qualitativen Nachweis einer FOXP3 Expression wurde zunächst eine konventionelle PCR durchgeführt. Um die Genexpression quantifizieren zu können wurden die Proben dann mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

2.2.2.1 Isolierung und Aufbereitung von RNA

Grundsätzlich umfasst die Isolierung intakter Gesamt-RNA drei Schritte. Zunächst muss die RNA aus den Zellen freigesetzt werden, um den für die RT-PCR benötigten Reagenzien zugänglich gemacht zu werden. Die dann freigesetzte RNA ist sehr empfindlich und muss vor allem vor dem Abbau durch RNasen geschützt werden. Außerdem werden unerwünschte Bestandteile wie DNA und Proteine eliminiert, da sie die RT-PCR stören könnten (Mülhardt, 2006).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Isolierung von RNA aus Nierengewebe mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Es basiert auf der Bindung von RNA an siliziumbeschichtete Membranen, anhand derer die RNA in Anwesenheit chaotroper Salze isoliert werden kann.

Um Gesamt-RNA aus den Gewebeproben zu extrahieren wurde zunächst eine Mischung aus RLT Puffer und β -Mercaptoethanol (Mischverhältnis 100:1) angesetzt. Der RLT Puffer des Qiagen Kits enthält ein Guanidinsalz, ein chaotropes Salz, welches Proteine denaturiert und zur Zelllyse führt, wodurch RNA aus den Zellen freigesetzt wird. Das β -Mercaptoethanol zerstört RNasen und dient somit dem Schutz der freigesetzten RNA. Jeweils 600 μ l des Gemisches wurden in mit Patientennummern versehene Cryo Tubes gegeben. Von jeder Gewebeprobe wurden jetzt etwa 30 mg des sich in RNAlater befindlichen Gewebes abgewogen und in die entsprechende Cryo Tube gegeben. Mit einem Homogenisierer wurde das Gewebe homogenisiert und anschließend für 3 Minuten auf höchster Stufe zentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abpipettiert, in beschriftete Eppendorfgefäße gegeben und mit der gleichen Menge 70

%igem Ethanol vermischt. Von jeder Probe wurden maximal 700 µl auf eine Säule des RNeasy Mini Kits gegeben. Die Säulen wurden dann jeweils in 2 ml Gefäße gestellt und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit in den Gefäßen wurde verworfen und jeweils das restliche Gemisch aus RNA und Ethanol auf die entsprechende Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde die gesammelte Flüssigkeit wieder verworfen.

Im nächsten Schritt erfolgte ein DNase-Verdau, um potentielle DNA-Kontaminationen auszuschließen. Hierzu wurden zunächst je 350 µl RW1 Puffer auf die Säulen gegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden auf jede Säule je 10 µl DNase-Lösung und 70 µl RDD-Puffer gegeben und etwa 15 Minuten einwirken gelassen. Nach erneuter Zugabe von RW1-Puffer (350 µl) mit anschließender Zentrifugation und zweimaliger Zugabe von RPE-Puffer (500 µl) sowie Zentrifugation folgte die Elution der aufgereinigten RNA. Die Säulen wurden in 1,5 ml Gefäße gestellt und auf jede Säule wurden 35 µl RNase freies Wasser gegeben. Nach Zentrifugation über eine Minute bei 10000 rpm erhielt man in den Gefäßen das abzentrifugierte Eluat der RNA. Um die RNA vor dem Abbau durch RNasen zu schützen, wurden zu jeder Probe 0,3 µl RNasin, ein RNase-Inhibitor, hinzugegeben.

2.2.2.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA

Die RNA-Konzentration und die erreichte Reinheit der RNA nach Extraktion wurden im Spektralphotometer (Gene Ray UV Photometer, Biometra) bei 260 und 280 nm bestimmt. Dazu wurde die RNA 1:35 mit Aqua bidest verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm die optische Dichte (OD) gemessen. Die RNA-Konzentration errechnet sich aus der Absorption bei 260 nm (OD_{260nm}), dem Verdünnungsfaktor (V) und einem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor (F) nach folgender Formel: $OD_{260nm} \times V \times F$. Der Multiplikationsfaktor für RNA beträgt 40 (Mülhardt, 2006). Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient aus den jeweiligen Extinktionen bei 260 und 280 nm ermittelt (OD_{260nm} / OD_{280nm}). Dieser liegt für proteinfreie Nukleinsäurepräparationen zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.2.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Durch Reverse Transkription ist es möglich, aus RNA cDNA (*complementary* DNA) zu synthetisieren. Diese cDNA kann dann als Ausgangsmaterial für eine PCR dienen, welche die Amplifizierung einer gewünschten Gensequenz ermöglicht.

Zum Umschreiben von RNA in cDNA können grundsätzlich sequenzspezifische Oligonukleotide oder Oligo-dT-Primer verwendet werden. Oligonukleotide, auch *Random Hexamers* genannt, binden zufällig ihre komplementäre Sequenz, während Oligo-dT-Primer an den Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNAs binden. In der vorliegenden Arbeit kamen letztgenannte Oligo-dT-Primer zur Anwendung, in deren Gegenwart RNA-abhängige DNA-Polymerasen, so genannte Reverse Transkriptasen, in 5'-3'-Richtung komplementäre DNA von der mRNA exprimierter Gene synthetisieren (Mülhardt, 2006).

Die aus den Nierengewebeproben der Patienten isolierte RNA wurde als *Template* für die cDNA-Synthese eingesetzt. Es wurde jeweils 1 µg der extrahierten Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo-dT-Primer und 1 µl 10 mM dNTP-Mix angesetzt und mit Aqua bidest auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz inkubierte dann 10 Minuten bei 70 °C im Thermocycler. Im Anschluss wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Dann wurde das Enzym für die Reverse Transkription in folgendem Mix hinzugegeben.

RT-Mix für einen Ansatz

Volumen	Reaktionskomponente
2 µl	10 x RT Puffer
6 µl	Aqua bidest
1 µl	RNase Inhibitor
1 µl	RT

Die Reaktion wurde im Thermocycler der Firma Biozym bei 50 °C über 50 Minuten durchgeführt.

2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um die Expression von FOXP3 im Nierengewebe zu untersuchen, wurde ein bestimmter Sequenzabschnitt des FOXP3-Gens mittels PCR amplifiziert. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren. Kleinste DNA-Mengen eines bestimmten Sequenzabschnittes können spezifisch vervielfältigt werden. Das Reaktionsprinzip entspricht grundsätzlich der natürlich vorkommenden Replikation bzw. Verdopplung von DNA *in vivo*: Eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize (Mülhardt, 2006). Neben DNA-Analysen werden heute auch Untersuchungen von RNA mit Hilfe der PCR durchgeführt (RT-PCR) (Delidow *et al*, 1989). So auch in der vorliegenden Arbeit. Die isolierte RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben. Diese konnte dann als *Template* in eine RT-PCR eingesetzt und spezifisch amplifiziert werden.

Für eine PCR benötigt man neben der zu untersuchenden Ausgangs-DNA (*template*) eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Es wurde in dieser Arbeit die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq) verwendet. Außerdem werden zwei spezifische Oligodesoxynukleotide, die so genannten Primer benötigt. Sie dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Replikation. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.6 aufgeführt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, wobei der eine Primer komplementär zum *sense*-, der andere zum *antisense*-Strang ist. Die Primer sind mit den 3'-terminalen Enden zueinander orientiert angeordnet, sodass sie den zu amplifizierenden DNA-Sequenzabschnitt überspannen. Als weitere Komponenten werden für die Reaktion die vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) sowie ein elektrolythaltiger Puffer benötigt (Mülhardt, 2006; Newton & Graham, 1994).

Der typische Ablauf einer PCR besteht aus drei wiederholt aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten:

- 1. Denaturierung** – durch Erhitzen des PCR-Ansatzes auf 94 °C denaturiert das *Template*, die beiden komplementären Stränge werden getrennt
- 2. Primerhybridisierung** – es folgt die Abkühlung des Ansatzes auf 55 °C, was zu einer spezifischen Hybridisierung (*Annealing*) der Primer an ihre komplementäre DNA-Sequenz führt
- 3. Elongation** – im letzten Schritt, der bei 72 °C durchgeführt wird, verlängert die DNA-Polymerase das 3'-Ende der Primer und synthetisiert einen dem *Template* komplementären neuen Strang, welcher im nächsten Zyklus als neues *Template* dient

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt, der den PCR-Ansatz präzise auf die für den jeweiligen Reaktionsschritt benötigte Temperatur erhitzt und kühlt. Unter optimalen Reaktionsbedingungen wird die von den Primern erkannte DNA-Sequenz mit jedem Zyklus verdoppelt. Nach etwa 20 bis 30 Zyklen ist so viel PCR-Produkt synthetisiert worden, dass dieses durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand seiner Größe identifiziert werden kann.

2.2.2.5 Konventionelle RT-PCR

Um die Expression von FOXP3 im Nierengewebe zu untersuchen, wurde die umgeschriebene cDNA als *Template* in eine konventionelle RT-PCR eingesetzt. Mit einem spezifischen Primer wurde die Gensequenz von FOXP3 amplifiziert. Um zu kontrollieren, ob die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgreich war, wurde nach der Transkription zunächst von jeder Probe ein Referenzgen, das sogenannte *Housekeeping* Gen, amplifiziert. Das Referenzgen ist ein ubiquitär vorhandenes Gen und kann somit als positive Kontrolle eingesetzt werden. Bei erfolgreicher Transkription der RNA in cDNA ist es in jeder Probe vorhanden. In dieser Arbeit wurde das *Housekeeping* Gen HPRT 1R verwendet. Im Anschluss wurde von jeder Probe der Patientenreihe 1 µl cDNA mit 49 µl des PCR-Mixes angesetzt. Auf eine sorgfältige Beschriftung der Eppendorfgefäße mit Probennummer, Primer und Datum war hierbei stets zu achten. Eine Negativkontrolle mit allen Komponenten außer der cDNA wurde ebenfalls mitgemessen.

PCR-Mix für einen Ansatz

Volumen	Reaktionskomponente
5 µl	10 x PCR-Puffer
1 µl	10 mM dNTP-Mix
2 µl	FOXP3-Primer
0,25 µl	Taq Polymerase 5 U/µl
40,75 µl	Aqua bidest
49 µl	

Als Thermocycler wurde der PCR Thermocycler PTC 200 der Firma Biozym Scientific genutzt. Es wurden je 35 Zyklen durchgeführt.

Programm

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
Start	95	240
Denaturierung	95	30
Annealing	59	30
Elongation	72	60
Finale Elongation	72	300
Ende	8	

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Identifizieren der PCR-Produkte wurden diese mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht. Für das Gel wurden in einem Erlenmeyerkolben 2 g Agarose mit 100 ml Elektrophoresepuffer (1xTBE) gemischt und in der Mikrowelle für etwa 3 Minuten zu einer klaren Flüssigkeit gekocht. Nach Zugabe von 10 µl des in die DNA interkalierenden Farbstoffes Gel-red wurde mit Hilfe eines Kamms ein Gel mit Taschen gegossen. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegeben und mit TBE-Puffer bedeckt. In die beiden Geltaschen an den Seiten des Gels wurde jeweils ein mit Ladepuffer versetzter Größenstandard (DNA-Ladder 100 bp, Promega, USA) pipettiert, der eine spätere Zuordnung der aufgetrennten DNA-Fragmente ermöglicht. Der Ladepuffer erleichtert hierbei das Pipettieren in die Geltaschen, da er einerseits die Dichte der Lösungen erhöht und zum anderen einen Farbstoff enthält, wodurch die Lösungen sichtbar werden. Die PCR-

Proben wurden nun in die übrigen Geltaschen pipettiert. Da die Proben bereits durch einen Farbstoff in der Taq Polymerase gefärbt waren, musste kein Ladepuffer hinzu gegeben werden. Nach Anlegen einer Spannung wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei größere DNA-Fragmente das Gel aufgrund der Siebstruktur der Agarose langsamer durchlaufen als kleinere DNA-Moleküle (Mülhardt, 2006). Bei einer Spannung von 115 Volt liefen die Gele etwa 1-1,5 Stunden. Mit Hilfe von UV-Licht und dem in die DNA interkalierenden Farbstoff wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht und anhand des Größenstandards identifiziert. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden Gelfotos angefertigt.

2.2.2.7 *Quantitative real-time RT-PCR*

Ein Nachteil der konventionellen PCR ist, dass sie zwar die Expression eines Zielgens hoch sensitiv qualitativ nachweist, jedoch die quantitative Untersuchung einer Genexpression nur sehr begrenzt möglich ist (Schrader *et al.*, 2003). Einen großen Fortschritt brachte hier die Etablierung der *real-time* PCR, die eine Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit ermöglicht.

Die quantitative real-time PCR ist eine Amplifizierungsmethode, die auf dem herkömmlichen Prinzip der PCR beruht und darüber hinaus die Quantifizierung der Menge der ursprünglich vorhandenen DNA-Moleküle ermöglicht. Dabei werden während der Reaktion mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes von den PCR-Produkten emittierte Signale detektiert und quantifiziert. Diese Signale verstärken sich proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes und lassen somit Rückschlüsse auf die primär eingesetzte *Template*-Menge zu. Während der exponentiellen Phase der PCR wird das Fluoreszenzsignal während jedes einzelnen Zyklus gemessen. Die Quantifizierung beruht auf der Bestimmung eines so genannten „Threshold Cycles“ (Ct) zu Beginn der exponentiellen Phase. Dies ist der Zyklus, bei dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrundsignal abhebt. Der Ct-Wert ist niedrig, wenn primär eine große *Template*-Menge vorlag. Er ist umso höher, je weniger des zu amplifizierenden Gens im Ausgangsmaterial vorhanden war. Um Variationen in der Ausgangsmenge der verschiedenen DNA-Proben auszugleichen, sollte ein Referenzgen, das so genannte *Housekeeping* Gen, mitgemessen werden, mit welchem das Zielgen normalisiert werden kann. Ein Referenzgen ist idealerweise ein ubiquitär vorhandenes Gen, das möglichst gering reguliert wird und zwischen Zelltypen

(Tumor, Normalgewebe) nicht variiert (Mülhardt, 2006; Schrader *et al*, 2003). In dieser Arbeit wurde das *Housekeeping* Gen RPS9 verwendet.

2.2.2.8 Überprüfung der Spezifität der Amplifikation

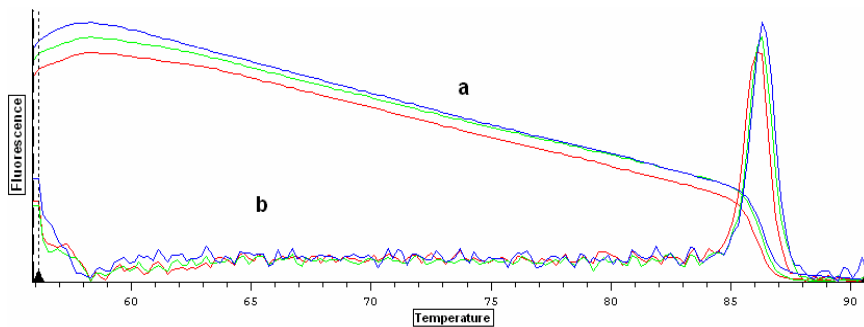
Zur Quantifizierung des entstandenen PCR-Produktes stehen verschiedene DNA-Detektionmethoden zur Verfügung, die auf der Messung von Fluoreszenz basieren. Es kommen dsDNA-interkalierende Farbstoffe (SYBR Green®, Ethidiumbromid) sowie sequenzspezifische fluoreszierende Sonden zum Einsatz (Hydrolisierungs sonden, *Molecular Beacons*, Hybridisierungs sonden). Vorteil dieser fluoreszierenden Sonden ist ihre spezifische Bindung an das *Template*. Sie sind jedoch deutlich teurer als interkalierende fluoreszierende Farbstoffe. Allen Fluoreszenzformaten ist gemeinsam, dass die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt (Holzapfel & Wickert, 2007; Mülhardt, 2006).

Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *real-time* RT-PCR wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Der Farbstoff lagert sich an doppelsträngige DNA. In gebundenem Zustand fluoresziert SYBR Green stärker, als wenn es frei in Lösung vorliegt, sodass durch die Aufzeichnung der Fluoreszenzemission die Amplifikation der Zielsequenz in jedem Zyklus detektiert werden konnte.

Unter ungünstigen Bedingungen interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff jedoch nicht nur in doppelsträngige DNA der Zielsequenz, sondern auch in doppelsträngige Primer-Dimere oder PCR-Beiprodukte. In der Fluoreszenzmessung des PCR-Produktes können diese nicht voneinander unterschieden werden. Die Spezifität des PCR-Produktes wurde daher am Ende der PCR mit einer Schmelzkurvenanalyse im iQ5 RT-PCR-System überprüft. Hierbei wurde das Amplifikat von 55 °C bis 90 °C erhitzt und die Fluoreszenz in Temperaturschritten von jeweils 0,2 °C kontinuierlich gemessen. Bei graphischer Darstellung der Fluoreszenz gegen die Temperatur kommt es dabei zu einem abnehmenden Signal. Die Steigung der Kurven wurde über die erste negative Ableitung der Fluoreszenz über die Zeit gegen die Temperatur berechnet. Dadurch ergaben sich Amplikon spezifische Schmelzpunktmaxima. Bei Auftreten von Primer-Dimeren oder unspezifischen Amplifikaten zeigten sich neben dem spezifischen

Schmelzpunktmaximum der Zielsequenz weitere Schmelzpunktmaxima. In diesem Falle wurde die Messung wiederholt und die PCR-Bedingungen wurden weiter optimiert, bis nur noch spezifische Amplifikate in der Schmelzkurvenanalyse nachweisbar waren. In Abbildung 9 ist die graphische Schmelzkurvenanalyse eines qRT-PCR Amplifikats dargestellt.

A:



B:

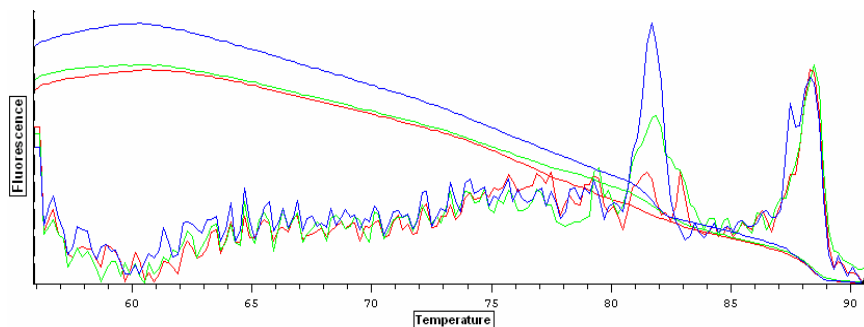


Abbildung 9 Graphische Schmelzkurvenanalyse eines qRT-PCR Amplifikats. A: Dissoziationskurve der Fluoreszenz gegen die Temperatur (a) und erste negative Ableitung (b) der Fluoreszenz über die Zeit gegen die Temperatur ($-d\text{Signal}/d\text{Zeit}$) mit Ausbildung eines typischen Peaks für den Schmelzpunkt des spezifischen Amplikons. B: Nachweis einer Primerdimer-Bildung.

2.2.2.9 Durchführung der quantitativen real time RT-PCR

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte quantitative *real time* RT-PCR wurde mit dem SYBR-Green QuantiTect PCR-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden anhand einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen die Effizienz der Amplifikation für das Zielgen sowie das *Housekeeping* Gen ermittelt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe eines cDNA-Gemischs mehrerer Proben erstellt. Es wurden sechs Verdünnungen mit einem Verdünnungsfaktor von 1:2, jeweils ausgehend von der vorherigen Probe erstellt. Aus der mittleren Differenz der Ct-Werte

zweier benachbarter Verdünnungen konnte dann mit folgender Formel die Effizienz berechnet werden:

$$E = 2^{\Delta C_t}$$

Bei optimalen Bedingungen wird die DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Dies entspräche einer Effizienz von 2,0 (= 100 %).

Im Anschluss musste die eingesetzte cDNA der Patientenreihe verdünnt werden, damit die Ct-Werte des zu untersuchenden Zielgens FOXP3 sowie des *Housekeeping* Gens RPS9 sicher in der exponentiellen Amplifikationsphase lagen. In einer Versuchsreihe wurde eine cDNA-Verdünnung von 1:5 ermittelt. Für einen PCR-Ansatz wurden der Primer und der PCR-Mix der Firma Qiagen mit Aqua bidest auf 24 µl Endvolumen aufgefüllt. Zu dem vorgelegten Ansatz wurde dann 1 µl cDNA gegeben. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde für die quantitative PCR jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Das heißt, es wurden pro ausgewählten Fall der Patientenreihe drei Ansätze gemessen. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der beiden Primer wurden zwei verschiedenen PCR-Ansätze nach folgendem Schema erstellt.

Einfacher PCR-Ansatz mit FOXP3 Primer

Volumen	Reaktionskomponente
12,5 µl	SYBR-Green QuantiTect PCR-Mix
2,5 µl	FOXP3 Primer sense/antisense
9 µl	Aqua bidest
24 µl	

Einfacher PCR-Ansatz mit RPS9 Primer

Volumen	Reaktionskomponente
12,5 µl	SYBR-Green QuantiTect PCR-Mix
0,1 µl	RPS9 Primer sense
0,1 µl	RPS9 Primer antisense
11,3 µl	Aqua bidest
24 µl	

Die Amplifikation erfolgte im iQ5 qPCR-System der Firma Bio Rad. Es wurden jeweils 45 Zyklen durchgeführt.

Ablauf der eingesetzten real time RT-PCR

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
Start	95	900
Denaturierung	94	15
Annealing	59	30
Elongation	72	30
Melting Programm	55,9 - 90,9	350
Ende	10	

2.2.2.10 Auswertung der real-time RT-PCR

Zur Auswertung der *real-time* RT-PCR stehen generell zwei Quantifizierungsstrategien zur Verfügung. Bei der **absoluten Quantifizierung** wird mittels einer Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannten Konzentrationen eine Standardkurve erstellt. Dabei werden die ermittelten Ct-Werte der Standardverdünnung gegen ihre logarithmische Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe dieser Standardkurve können die absoluten DNA-Konzentrationen der unbekannten Proben über den Ct-Wert abgelesen werden.

Die auch in dieser Arbeit angewandte **relative Quantifizierung** hingegen ermittelt nicht die absoluten Startkonzentrationen eines Zielgens, sondern bezieht die Expression des zu untersuchenden Gens relativ auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Referenzgen. Dabei wird die Menge der Ziel-DNA ins Verhältnis zur insgesamt in der Probe vorkommenden DNA gesetzt. Der Vorteil dieser Normalisierung durch ein *Housekeeping* Gen liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen, Gewebeeffekte oder Fehler bei der reversen Transkription betreffen gleichermaßen das Zielgen und das *Housekeeping* Gen. Eine Normalisierung mit der Expression eines *Housekeeping* Gens hebt somit Expressionsunterschiede durch individuelle Probeneffekte wieder auf. Die Berechnung der relativen Expression kann grundsätzlich nach zwei Methoden erfolgen: der Standardkurven-Methode oder der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode. Im Weiteren wird nur auf die $\Delta\Delta$ -CT-Methode eingegangen.

$\Delta\Delta$ -Ct-Methode

Bei der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wird die relative Expression des zu untersuchenden Gens in einer experimentellen Gruppe 1 (Tumor) auf eine Kontrollgruppe 2 (Normal) bezogen und der Expressionsunterschied (Ratio) ermittelt. Es erfolgt zunächst eine Normalisierung der Genexpressionen beider Gruppen zu einem Referenzgen (*Housekeeping* Gen). Daraus kann dann der Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen als Ratio berechnet werden.

Die $\Delta\Delta$ -Ct-Methode setzt eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus. Das entspräche einer optimalen *real-time* RT-PCR Effizienz von 2,0 oder 100 %. In der Praxis ist dies jedoch nicht immer gegeben. Die PCR Effizienz weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf (Pfaffl, 2001). Da aber schon geringe Schwankungen in der Effizienz von Zielgen und Referenzgen zu deutlichen Expressionsunterschieden führen, sind ausgehend von der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode Berechnungsmodelle entwickelt worden, die die unterschiedlichen Effizienzen berücksichtigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auswertung der *real-time* RT-PCR eine relative Quantifizierung mit dem effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodell nach Pfaffl (Pfaffl, 2001) durchgeführt (Formel 1). Die Methode berücksichtigt unterschiedliche Effizienzen von *Housekeeping* Gen, RPS9, und Zielgen, FOXP3, und ermittelt den relativen Expressionsunterschied (Ratio) von FOXP3 zwischen Tumorgewebeproben und Normalgewebeproben.

Formel 1

$$\text{Ratio}_{\text{T/N}} = \frac{E^{\Delta\text{Ct Zielgen (Normal-Tumor)}}}{E^{\Delta\text{Ct Referenzgen (Normal-Tumor)}}}$$

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer immunhistologischen Nachweismethode von FOXP3 positiven regulatorischen T-Zellen in der Niere

Zum Nachweis potentiell regulatorischer T-Zellen in humanem Nierengewebe wurde eine immunhistochemische Färbemethode nach dem Prinzip der ABC-Methode etabliert. Der Primärantikörper richtete sich gegen den nukleären Transkriptionsfaktor FOXP3, der als spezifischster Marker für Tregs gilt. Die Etablierung erfolgte in Nierengewebe, im NZK sowie in Tonsillengewebe. Als Ergebnis der Etablierung kann ein Färbeprotokoll dargebracht werden, das eine spezifische, kontrastreiche Darstellung FOXP3⁺ Zellen ermöglicht. Die positiven Zellen heben sich nach der Gegenfärbung deutlich von FOXP3⁻ Zellen ab. In Abbildung 10 ist eine Färbung mit dem Antikörper gegen FOXP3 nach dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokoll an gesundem Nierengewebe, Tumorgewebe sowie Tonsillengewebe zu sehen.

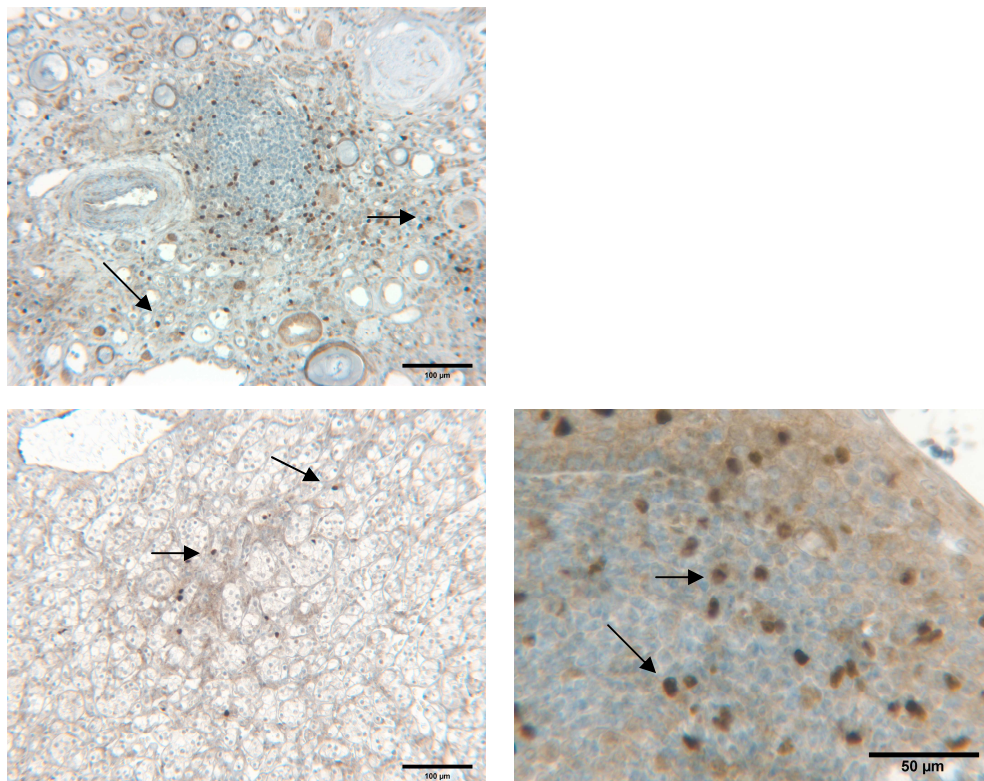


Abbildung 10 Immunhistochemische Färbung von Nieren-, Nierenzellkarzinom- und Tonsillengewebe zur Detektion FOXP3⁺ Zellen. Das etablierte Färbeprotokoll ermöglicht eine spezifische, kontrastreiche Darstellung FOXP3⁺ Zellen. Sie heben sich deutlich vom Hintergrund ab (Pfeil). Oben: Niere, Unten: Nierenzellkarzinom, Rechts: Tonsille. Gegenfärbung: Methylenblau.

Die Etablierung der Färbung umfasste verschiedene Optimierungsschritte. Zunächst konnte die Detektion des Antigens durch den Primärantikörper mit einer Vorbehandlung der Gewebe deutlich verbessert werden. Die durch die Formalinfixierung maskierten Antigene konnten durch eine Hitzebehandlung der Proben in einem Citratbad bei pH 6 freigelegt werden, was zu einem verbesserten Immunsignal führte. Eine zur Membran Permeabilisierung gebräuchliche Vorbehandlung des Gewebes mit Triton zeigte keine Verbesserung des Färbeergebnisses.

Unspezifische Hintergrundfärbungen bereiteten anfangs erhebliche Schwierigkeiten, FOXP3⁺ Zellen kontrastreich darzustellen. Eine Reduktion der Hintergrundreaktion konnte durch die Sättigung fixationsbedingt aktivierter Aldehyde mittels Inkubation der Proben in Ammoniumchlorid erzielt werden. Auch die Inkubation mit Normalserum aus dem Kaninchen erbrachte eine Verminderung unspezifischer Reaktionen.

Deutliche Signale wurden weiterhin in den Gefäßen beobachtet. Anhand der Kontrollen konnten spezifische Reaktionen jedoch ausgeschlossen werden. Alle Negativkontrollen, auch die nur mit DAB behandelte Kontrolle, zeigten ein verstärktes Signal in den Gefäßen und bestätigten somit eine unspezifische Umsetzung des DABs in den Erythrozyten. Durch eine Inkubation der Proben in einer 0,3 %igen Wasserstoffperoxidlösung über 15 Minuten konnte die endogene Peroxidase blockiert und somit die unspezifische Reaktion vermindert werden. Als problematisch erwies sich weiterhin eine unspezifische Färbung in den Nierentubuli. Die 1. Negativkontrolle (ohne Sekundärantikörper) sowie die 2. (ohne Primärantikörper) und 3. Negativkontrolle (nur ABC-Komplex und DAB) zeigten deutliche Signale in den Nierentubuli. Nur die 4. Negativkontrolle (nur DAB) wies kein Signal in den Nierentubuli auf (Abbildung 11). Dies bestätigte eine unspezifische Färbung durch endogenes Biotin. Dieses bindet Avidin aus dem ABC-Komplex und führt somit zu unspezifischen Hintergrundfärbungen. Durch Blockade des endogenen Biotins mit einem Avidin/Biotin Blocking Kit konnte die unspezifische Färbung in den Nierentubuli reduziert werden. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten erprobt. Nach jeweils 15 minütiger Inkubation mit Avidin und Biotin zeigte sich die bestmögliche Reduktion der Hintergrundreaktion. Diese konnte jedoch nicht vollständig eliminiert werden. Die Negativkontrollen konnten außerdem zeigen, dass der verwendete Sekundärantikörper (Rabbit-anti-Rat IgG, Vector) eine wahrnehmbare unspezifische Bindungseigenschaft aufweist: Die Zielfärbungen mit allen Komponenten sowie die zweite Negativkontrolle, bei denen jeweils der Sekundärantikörper eingesetzt wurde, zeigten gegenüber den drei Negativkontrollen ohne Sekundärantikörper eine stärkere Hintergrundreaktion (Abbildung 11). Diese Hintergrundreaktion war jedoch gering und störte nicht bei der Identifikation der FOXP3⁺ Zellen mit eindeutigem Signal.

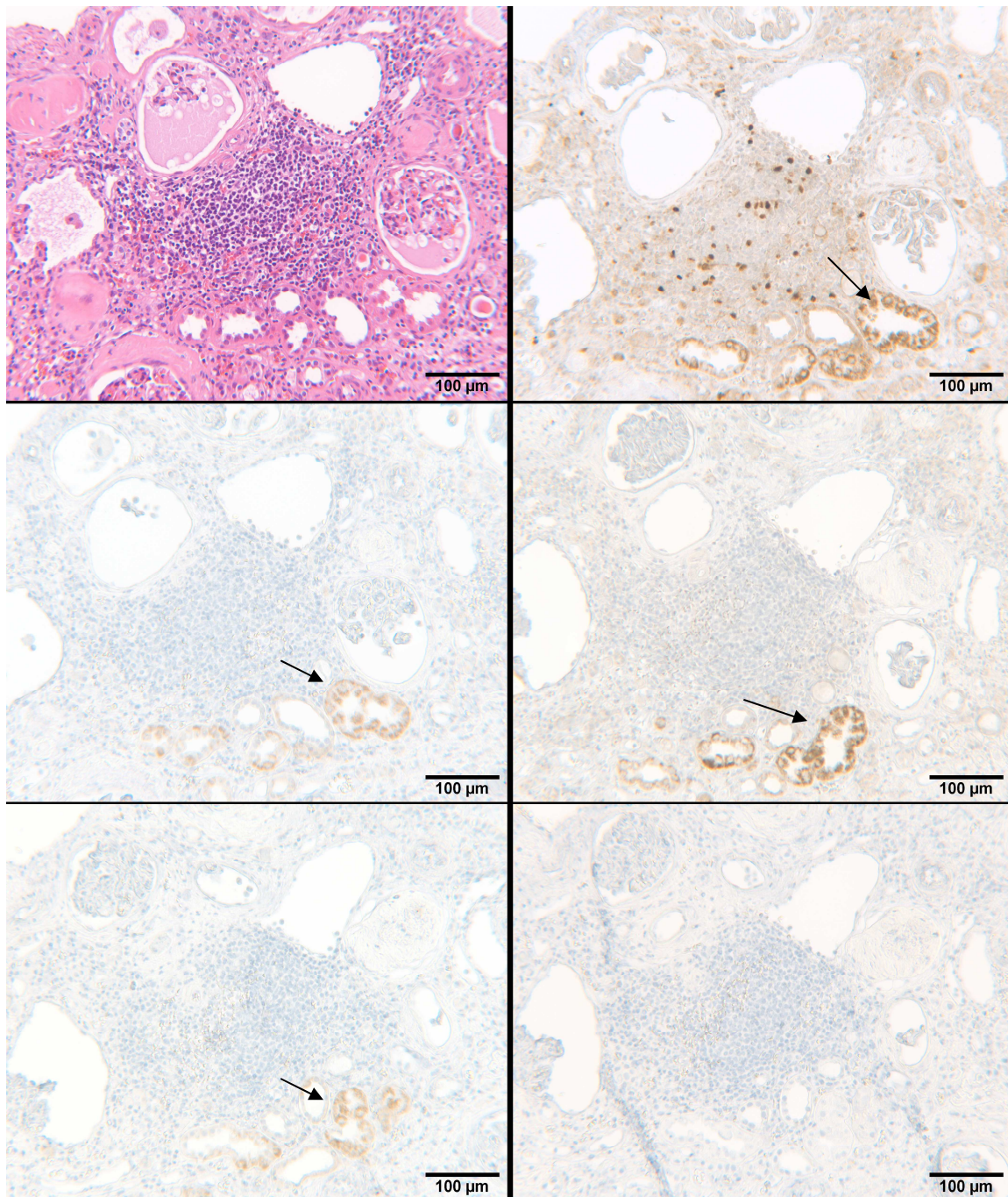


Abbildung 11 Etablierungsschritt der immunhistochemischen Färbemethode zum Nachweis FOXP3⁺ Zellen in der Niere. Deutliche Hintergrundreaktionen in den Nierentubuli zeigen sich in der Zielfärbung sowie in den ersten drei Negativkontrollen (Pfeil). Einzig die vierte Negativkontrolle weist keine Färbung in den Nierentubuli auf. Hiernach ist die Hintergrundreaktion auf eine unspezifische Bindungseigenschaft des ABC-Komplexes zurückzuführen, der allein in der vierten Negativkontrolle ausgelassen wurde. Sie konnte durch eine Avidin/Biotin-Blockade reduziert werden (vgl. Abb. 12). Eine dezente Hintergrundreaktion des gesamten Präparats zeigt sich zudem in der Zielfärbung und der 2. Negativkontrolle, bei denen im Gegensatz zu den übrigen Kontrollen der Sekundärantikörper eingesetzt wurde, sodass dieser hierfür verantwortlich gemacht werden kann. Oben links: HE-Färbung, Oben rechts: Zielfärbung, Mitte links: 1. Negativkontrolle, Mitte rechts: 2. Negativkontrolle, Unten links: 3. Negativkontrolle, Unten rechts: 4. Negativkontrolle. Gegenfärbung: Methylenblau.

In einer Antikörperversdünnungsreihe von 1:100 bis 1:5000 wurde eine Antikörperversdünnung von 1:300 als optimal ermittelt.

Als Ergebnis der Etablierung kann nun das dieser Arbeit beigelegte Protokoll einer immunhistochemischen Nachweismethode von FOXP3 in humanem Nierengewebe dargebracht werden. Die Färbemethode ermöglicht einen spezifischen, kontrastreichen Nachweis FOXP3⁺ Zellen in der Niere sowie im NZK. Abbildung 12 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von FOXP3 in der Niere sowie im NZK nach dem hier etablierten Protokoll.

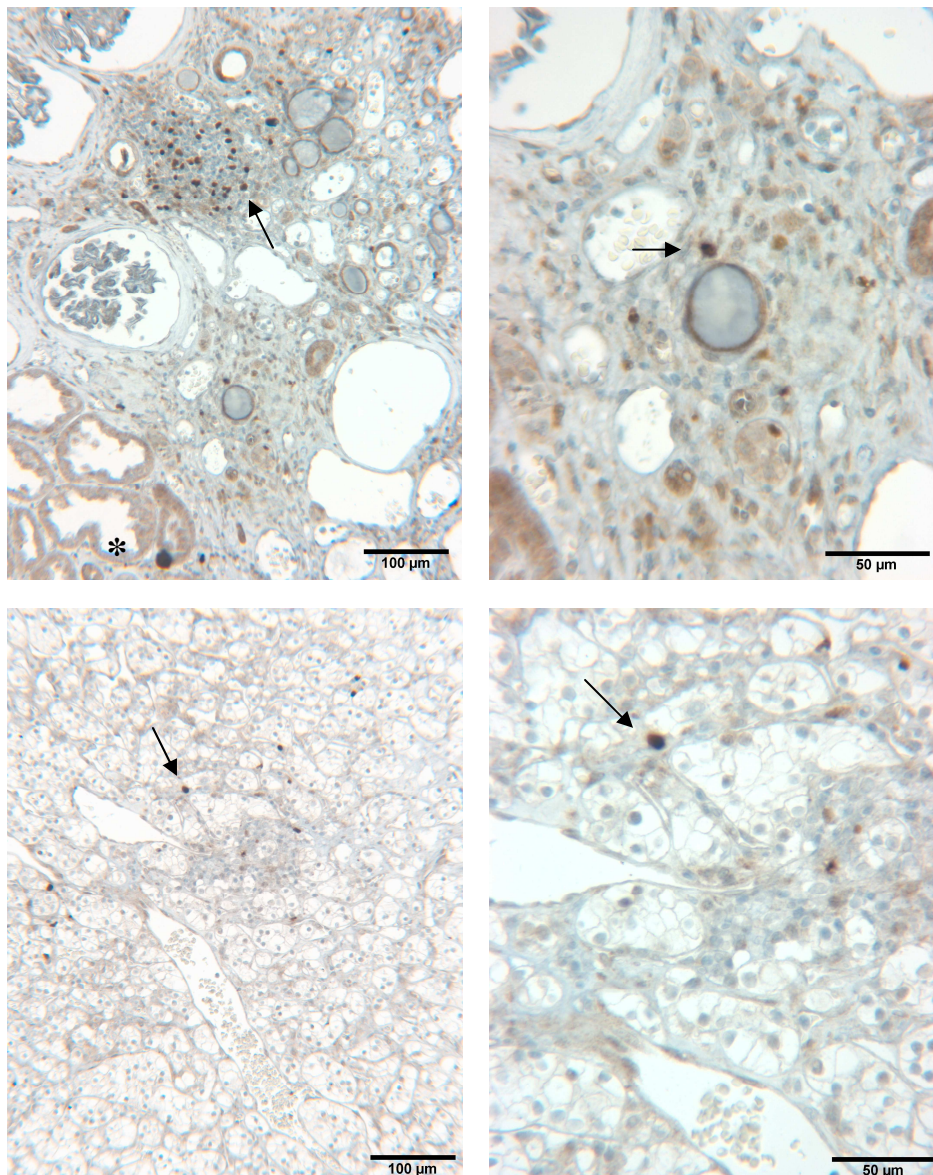


Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung von FOXP3 nach dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokoll. Die Färbung zeigt einen spezifischen und kontrastreichen Nachweis von FOXP3⁺ Zellen (Pfeil) sowohl in gesundem Nierengewebe (oben) als auch im NZK (unten). Eine unspezifische Reaktion in den Nierentubuli konnte durch Blockade von gewebeständigem Biotin und Avidin deutlich reduziert, jedoch nicht vollständig beseitigt werden (Stern). Gegenfärbung: Methylenblau.

3.2 Regulatorische T- Zellen im Nierenzellkarzinom

Das Vorkommen FOXP3 positiver Zellen im NZK wurde an einer Reihe Gewebeproben von 32 Patienten, die an einem klarzelligen NZK erkrankt waren, untersucht. Zum Vergleich wurde von den nephrektomierten Patienten jeweils gesundes Nierengewebe sowie Gewebe aus dem NZK untersucht. Mittels RT-PCR wurde die Transkription des FOXP3 Gens nachgewiesen. Eine immunhistochemische Färbung zeigte die Expression von FOXP3 auf Proteinebene.

Der immunhistochemische Nachweis von FOXP3 wurde an Gewebe von 30 der 32 Patienten durchgeführt, da bei zwei der Patienten (3 und 11) aufgrund des sehr zerfallenen, nekrotischen Gewebes keine Auswertung der Immunfärbung erfolgen konnte. Von 23 der 32 Patienten lag intakte RNA vor, die mittels RT-PCR auf das Vorhandensein von FOXP3 untersucht wurde. Insgesamt wurde das Vorkommen FOXP3 positiver T-Zellen bei 21 der 32 Patienten sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch untersucht.

3.2.1 Immunhistochemischer Nachweis von FOXP3 positiven Zellen im Nierenzellkarzinom

Mit einem gegen FOXP3 gerichteten monoklonalen Antikörper wurde das Vorkommen FOXP3⁺ T-Zellen im NZK immunhistochemisch untersucht. Gewebeproben von 30 Patienten, die an einem klarzelligen NZK erkrankt waren, wurden hierzu nach dem etablierten Protokoll gefärbt. 19 der Patienten litten nach der Stadieneinteilung des AJCC an einem NZK in Tumorstadium I (Stadium I: T1, M0, M0). Vier Patienten befanden sich in Stadium II (Stadium II: T2, N0, M0), drei Patienten in Stadium III (Stadium III: T3, N0, M0 oder T1-3, N1, M0) und vier Patienten wiesen Tumorstadium IV auf (Stadium IV: T4, N0/N1, M0 oder jedes T, N2, M0 oder jedes T, jedes N, M1). Von jedem Patienten wurde Tumorgewebe sowie angrenzendes gesundes Nierengewebe untersucht und bezüglich des Färbeverhaltens miteinander verglichen. Das Gewebe wurde dabei so ausgewählt, dass sowohl Tumor- als auch Normalgewebe auf einem histologischen Schnitt lagen und die Grenzregion zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe darauf zu sehen war.

Die Färbung konnte zeigen, dass in allen 30 Gewebeproben FOXP3⁺ Zellen vorhanden waren. Diese zeigten im mikroskopischen Bild eine Braunfärbung des Zellkörpers und hoben sich deutlich vom Hintergrund ab (Abbildung 13).

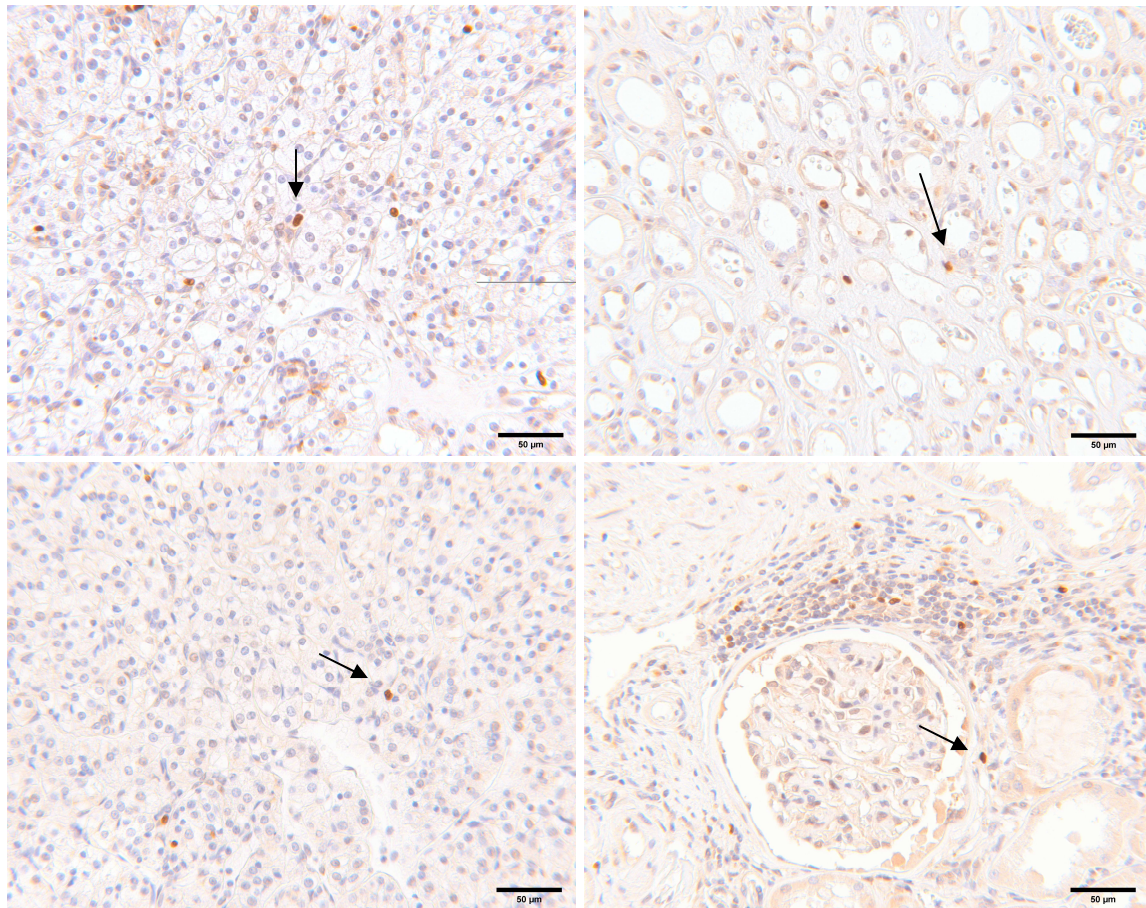


Abbildung 13 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis FOXP3⁺ Zellen im NZK (links) und angrenzendem normalen Nierengewebe (rechts). FOXP3⁺ Zellen konnten spezifisch und kontrastreich angefärbt werden (Pfeil). Im Tumorgewebe wie im Normalgewebe wurden FOXP3⁺ Zellen nachgewiesen. Gegenfärbung: Hämalaun.

FOXP3 positive T-Zellen fanden sich sowohl im Tumorgewebe als auch im Normalgewebe. Lediglich drei der Patienten (2, 5, 25) wiesen im Normalgewebe keine positiven Zellen auf. Die semi-quantitative Auswertung (Kapitel 2.2.1.5) der gefärbten Präparate ergab ein vermehrtes Vorkommen FOXP3 positiver T-Zellen im Tumorgewebe gegenüber angrenzendem Normalgewebe. Bei 26 Nierenproben waren mehr positive Zellen im Tumorgewebe als im Normalgewebe, nur 4 Patienten (4, 7, 30, 31) zeigten hingegen mehr positive Zellen im Normalgewebe als im Tumorgewebe. Abbildung 14 zeigt die Verteilung FOXP3 positiver Zellen in Tumor- und Normalgewebe der 30 Patienten. Für jeden Patienten ist die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld sowohl für Normalgewebe als auch für Tumorgewebe angegeben.

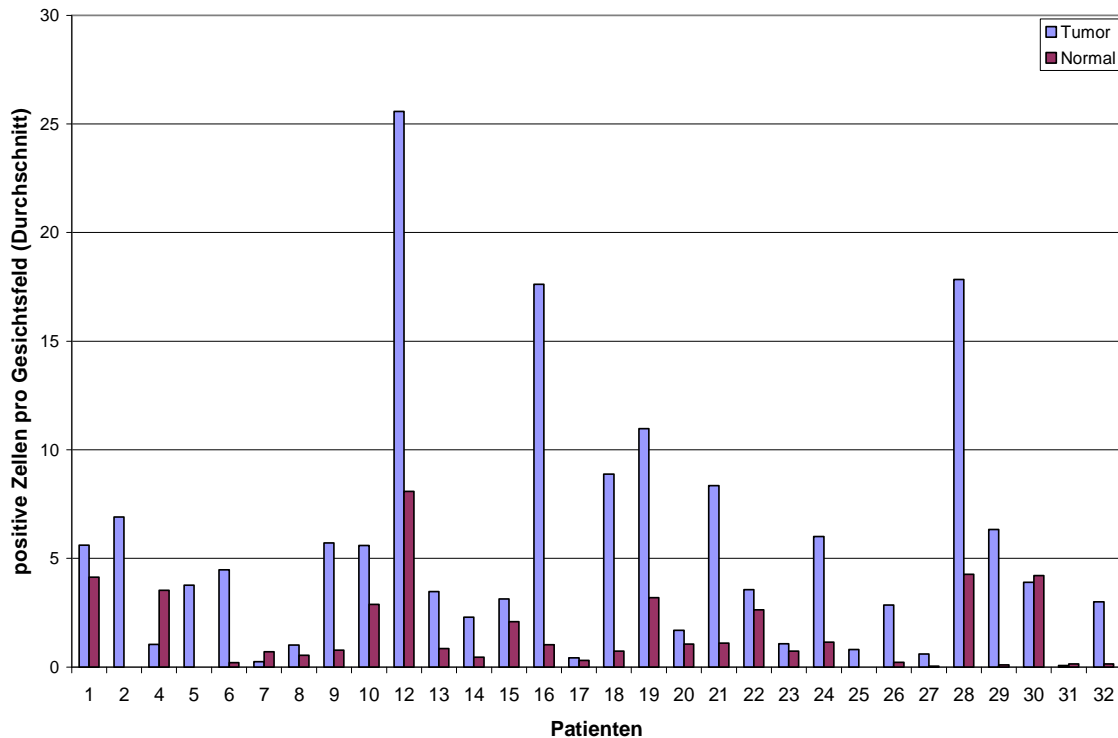
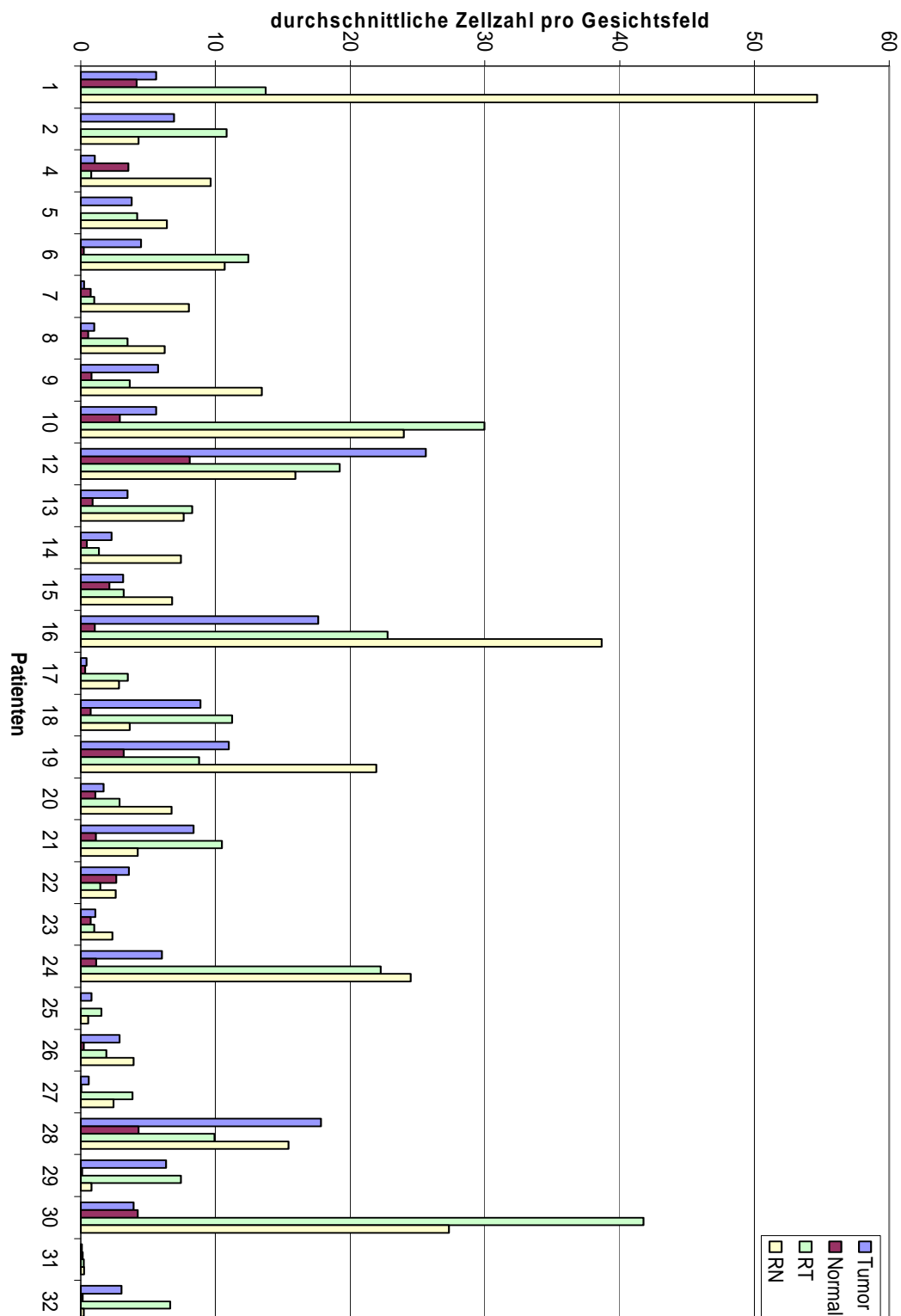


Abbildung 14 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis FOXP3 positiver Zellen in 30 Primärtumoren (blau) sowie dem angrenzenden normalen Nierengewebe (rot). Die Durchschnittswerte positiver Zellen pro Gesichtsfeld zeigen die Verteilung FOXP3 positiver Zellen im Tumor und im Normalgewebe. Bei 26 Patienten konnte ein vermehrtes Vorkommen von FOXP3 im Tumor nachgewiesen werden. Nur vier Patienten (4, 7, 30, 31) wiesen mehr positive Zellen im Normalgewebe als im Tumorgewebe auf.

Eine deutliche Akkumulation positiver Zellen zeigte sich in der Grenzregion zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe. Die Grenzregion wurde auf jedem Schnitt genauer untersucht. Eine Unterteilung der Region in ein Randgebiet im Normalgewebe (RN) und ein Randgebiet im Tumorgewebe (RT) erwies sich als sinnvoll (Kapitel 2.2.1.5). Für jede Probe wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Gesichtsfeld für die Bereiche Tumorgewebe (T), Normalgewebe (N), Randgebiet im Tumorgewebe (RT) und Randgebiet im Normalgewebe (RN) ermittelt. In der Auswertung zeigten 27 Patienten mehr positive Zellen in einem Randgebiet als mitten im Gewebe, wohingegen nur bei 3 Nierenproben (Patient 12, 22, 28) mehr positive Zellen mitten im Gewebe als in einem der Randgebiete vorkamen. Es zeigte sich jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen dem Randgebiet im Tumor und dem Randgebiet im Normalgewebe. 17 Patienten wiesen im RN mehr positive Zellen auf als im RT, wohingegen 13 Patienten im RT mehr positive Zellen zeigten als im RN.

Abbildung 15 auf der folgenden Seite zeigt die Verteilung FOXP3 positiver Zellen in den vier definierten Bereichen bei 30 Patienten mit histologisch nachgewiesenem NZK. Insgesamt fanden sich die meisten positiven Zellen bei 15 Patienten im RN, bei 12 Patienten im RT sowie bei 3 Patienten mitten im Tumorgewebe. Die höchste Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld in einer Region fand sich bei den Patienten 1 im RN, 10 im RT und 16 im RN.

Abbildung 15 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis FOXP3 positiver Zellen in 30 Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesichertem NZK. Für vier definierte Bereiche im histologischen Präparat ist die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld angegeben. Es konnten bei 27 Patienten mehr positive Zellen in einem der beiden Randgebiete nachgewiesen werden als in den Bereichen Tumor- oder Normalgewebe. Nur drei Patienten (12, 22, 28) wiesen in den Randgebieten eine geringere Zellzahl auf als mitten im Tumorgewebe.



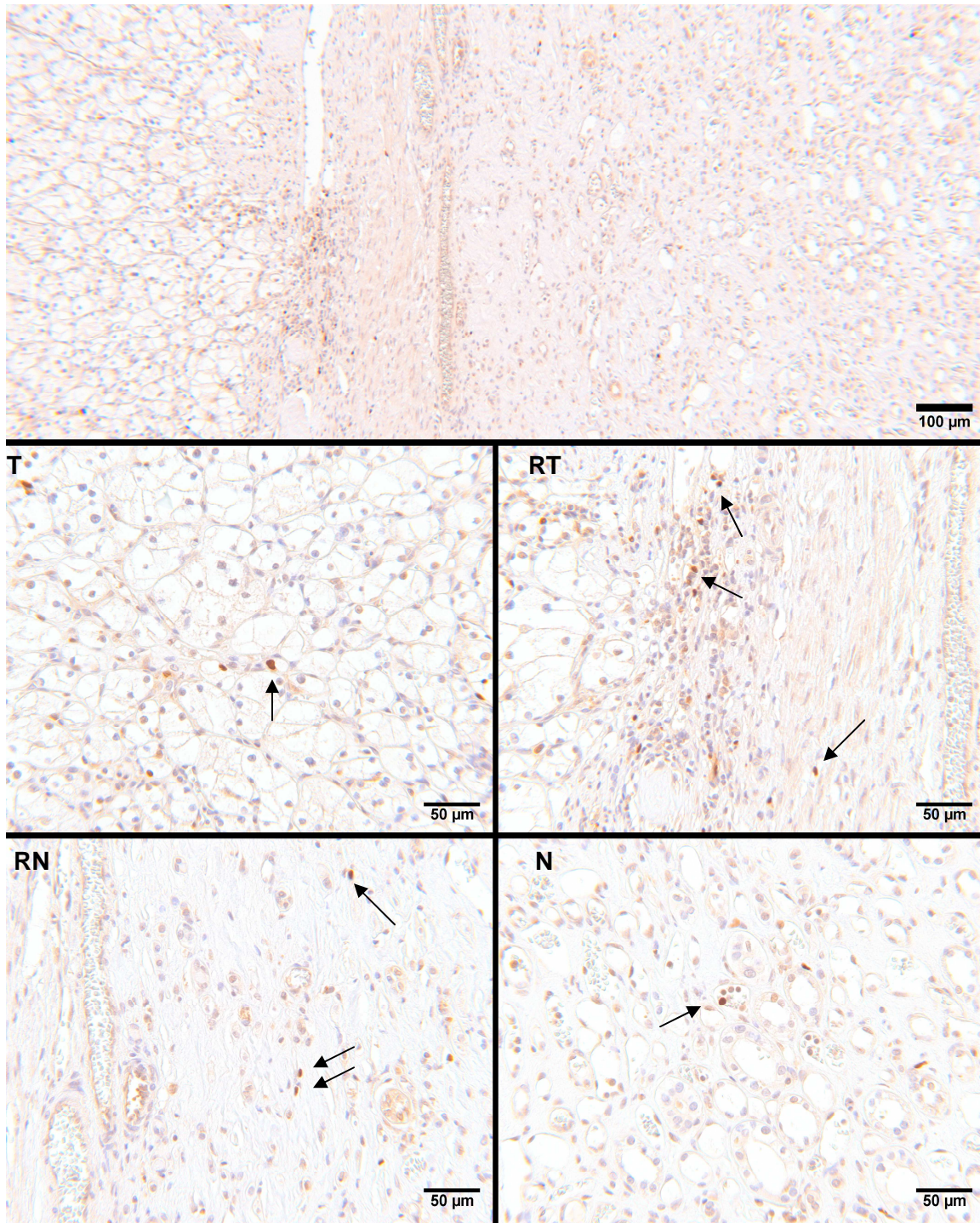


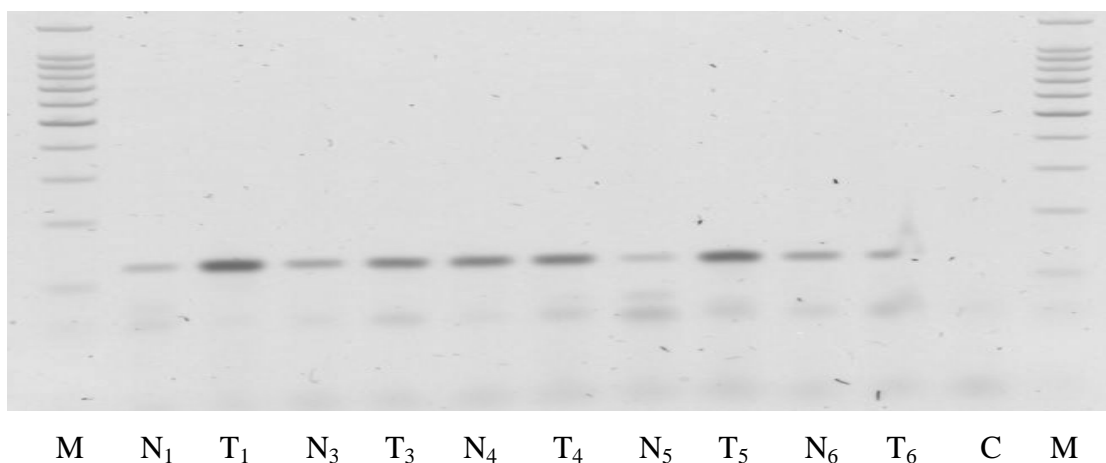
Abbildung 16 Immunhistochemischer Nachweis FOXP3⁺ Zellen im Primärtumor sowie angrenzendem Normalgewebe am Beispiel des Patienten Nr. 21. Positive Zellen (Pfeil) konnten in den vier Bereichen Tumorgewebe (T), Randgebiet im Tumorgewebe (RT), Normalgewebe (N) und Randgebiet im Normalgewebe (RN) nachgewiesen werden. Es zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen positiver Zellen im Grenzgebiet zwischen Tumor- und Normalgewebe (RN + RT). Oben: Übersicht mit den vier Bereichen, wobei links Tumorgewebe und rechts Normalgewebe zu sehen ist. Gegenfärbung: Hämalaun.

3.2.2 Molekularbiologischer Nachweis von FOXP3 im Nierenzellkarzinom

Die Expression von FOXP3 mRNA wurde in Tumorgewebe sowie korrespondierendem normalen Nierengewebe von 23 Patienten mit primärem NZK untersucht und verglichen. Die aus den Gewebeproben gewonnene Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die gesuchte Gensequenz mit einer konventionellen RT-PCR amplifiziert. Darüber hinaus wurde die Expression des *Housekeeping* Gens HPRT 1R untersucht und quantifiziert. Dies diente zur Kontrolle der Qualität wie Quantität der aus den einzelnen Gewebeproben gewonnenen RNA bzw. der konsekutiv synthetisierten cDNA.

Nachdem die Gesamt-RNA aus den Gewebeproben extrahiert worden war, wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Für die konventionelle RT-PCR wurde jeweils 1 µl der erstellten cDNA als *Template* sowie nukleinsäurefreies Wasser als Negativkontrolle eingesetzt. Die Annealingtemperatur der Primerpaare lag bei 59 °C.

Mit der semi-quantitativen RT-PCR Technik (35 Zyklen) konnte FOXP3 in allen Gewebeproben bis auf einer (Patient 19 Normalgewebe) nachgewiesen werden. Es zeigten sich zwischen den 23 getesteten Nieren- und Tumorproben deutliche Unterschiede in der FOXP3-Expression. Bei allen Patienten außer dreien konnte eine stärkere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe verglichen mit dem angrenzenden Normalgewebe nachgewiesen werden. Lediglich bei den Proben der Patienten 4, 6 und 11 konnte kein deutlicher Unterschied in der Expression von FOXP3 in Tumorbeziehungsweise Normalgewebe ausgemacht werden (Abbildung 17).



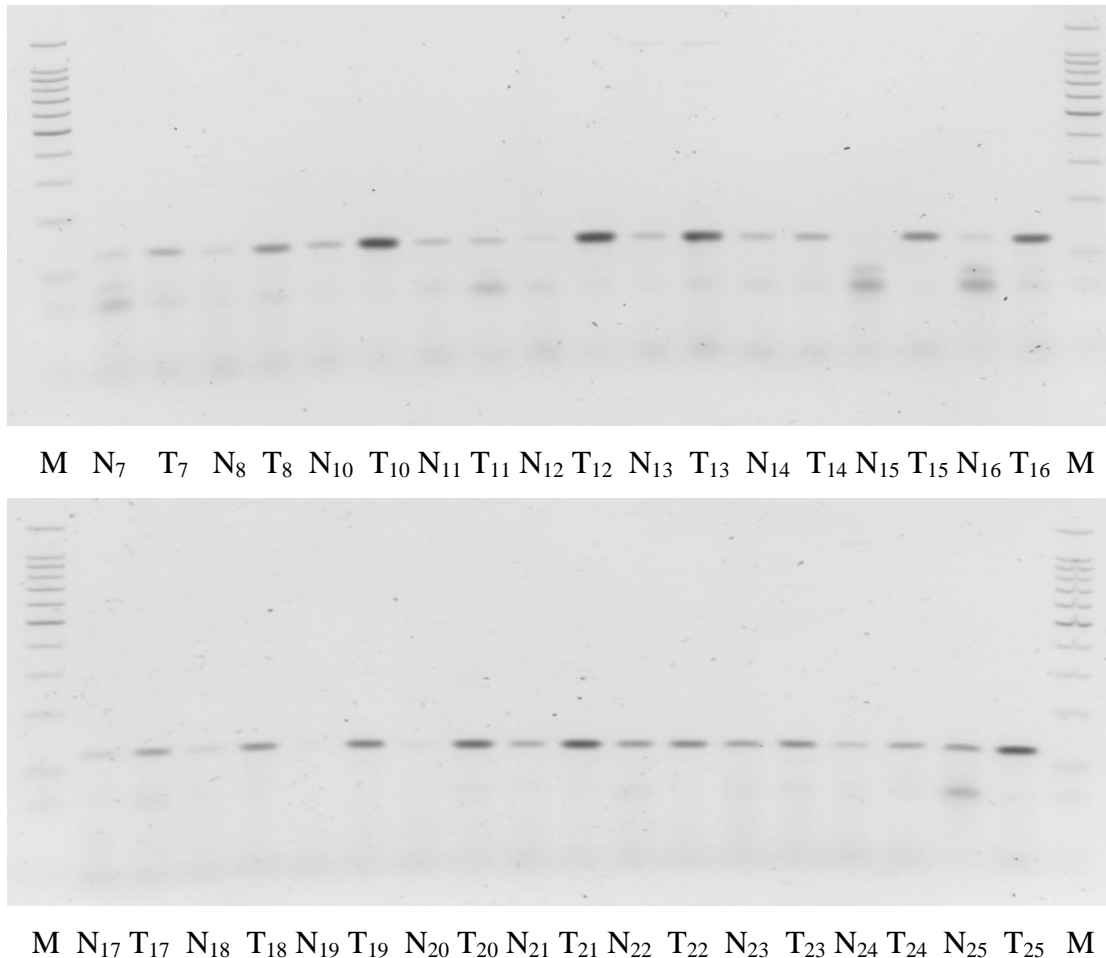


Abbildung 17 Konventionelle RT-PCR zur Untersuchung der FOXP3 Expression in 23 Primärtumoren (T) sowie dem angrenzenden normalen Nierengewebe (N) von Patienten mit histologisch nachgewiesenem NZK. Abgesehen von den Proben 4, 6 und 11 zeigte sich nach 35 Zyklen in allen Tumorproben eine stärkere Expression von FOXP3 als in den korrespondierenden Proben von normalem Nierengewebe. C = Kontrolle ohne cDNA, M = DNA-Ladder 100 bp.

Das *Housekeeping* Gen, das der Kontrolle der Qualität wie Quantität der einzelnen cDNA Proben diente, wurde in allen Proben deutlich exprimiert. Einzig in Probe 19 Normalgewebe zeigte sich eine deutlich geringere Expression des Referenzgens, was auf eine geringe cDNA Menge (bspw. durch fehlerhafte Transkription) schließen lässt. Dies könnte auch Ursache der fehlenden FOXP3 Expression in Probe 19 Normalgewebe sein (siehe Abbildung 17). Bei allen übrigen Proben wurde HPRT1R sowohl im Tumorgewebe als auch im Normalgewebe deutlich exprimiert (Abbildung 18).

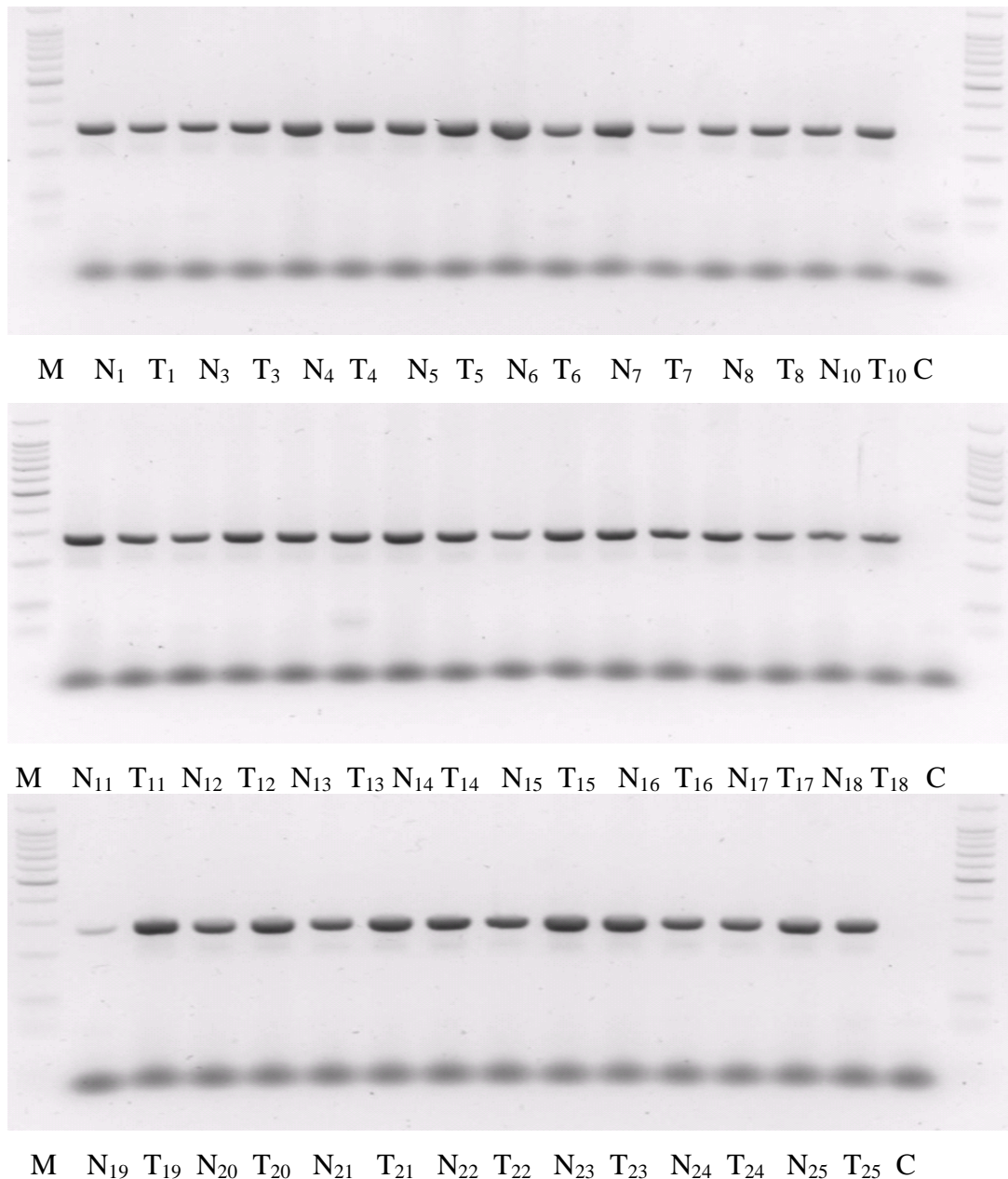


Abbildung 18 RT-PCR zur Untersuchung der Expression des Housekeeping Gens HPRT1R in 23 Primärtumoren (T) sowie dem angrenzenden normalen Nierengewebe (N). HPRT1R wird sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe deutlich exprimiert. Einzige Probe 19 zeigt eine nur geringe Genexpression im Normalgewebe. C = Kontrolle ohne RT, M = DNA-ladder.

Zur genaueren Quantifizierung der FOXP3 Expression wurden die 23 Nieren- und Tumorproben anschließend mittels *real time* RT-PCR untersucht. Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA-Proben auszugleichen, wurden die Expressionen des Zielgens mit einem Referenzgen, dem *Housekeeping* Gen, normalisiert – das heißt, die Menge der Ziel-DNA wurde mit der in der jeweiligen Probe insgesamt vorhandenen DNA ins Verhältnis gesetzt. Als *Housekeeping* Gen

wurde RPS9 verwendet. Die Quantifizierung der FOXP3 Expression erfolgte dabei über die Ermittlung des sogenannten „Threshold Cycle“, dem Ct-Wert (Kapitel 2.2.2.7). Der Ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Hintergrundsignal abhebt. Er ist niedrig, wenn primär eine große *Template*-Menge vorlag. Er ist umso höher, je weniger des zu amplifizierenden Gens im Ausgangsmaterial vorhanden war. Abbildung 19 zeigt am Beispiel von Tumor- und Nierengewebeproben des Patienten 21 das Fluoreszenzsignal der FOXP3-Amplifikate während der einzelnen Zyklen des PCR-Durchgangs. Der Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich ansteigt, ist der Ct-Wert.

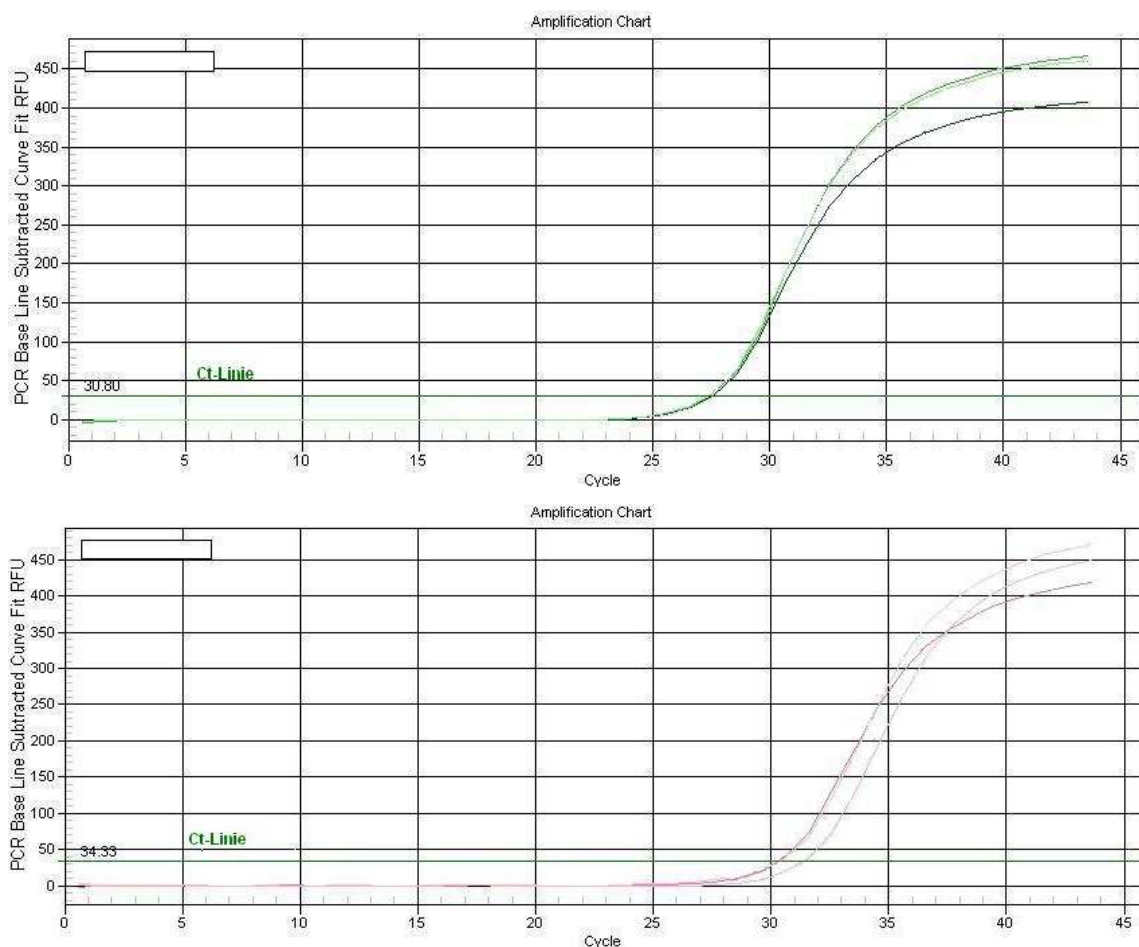
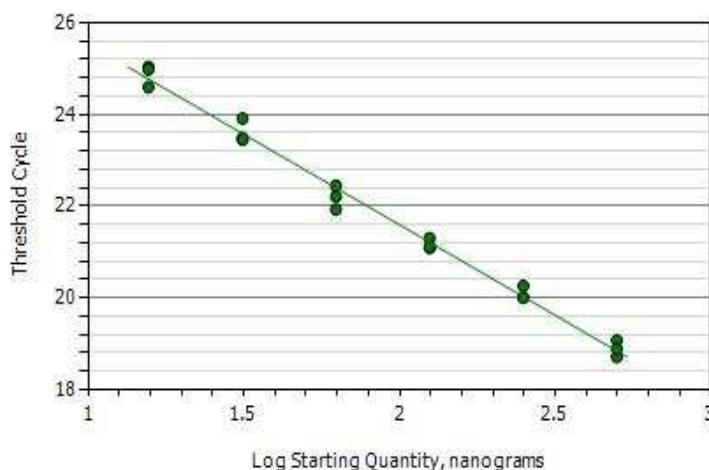


Abbildung 19 Exemplarische Fluoreszenzemission während einer *real-time* RT-PCR zum Nachweis von FOXP3 mit Gewebeproben aus Tumorgewebe (oben) sowie korrespondierendem Normalgewebe (unten) am Beispiel des NZK-Patienten 21. Der Zyklus, in dem sich das Signal erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt, definiert den Ct-Wert. Im Tumorgewebe ist der Ct-Wert niedriger (30,80) als im angrenzenden normalen Nierengewebe (34,33), was auf eine höhere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe hindeutet.

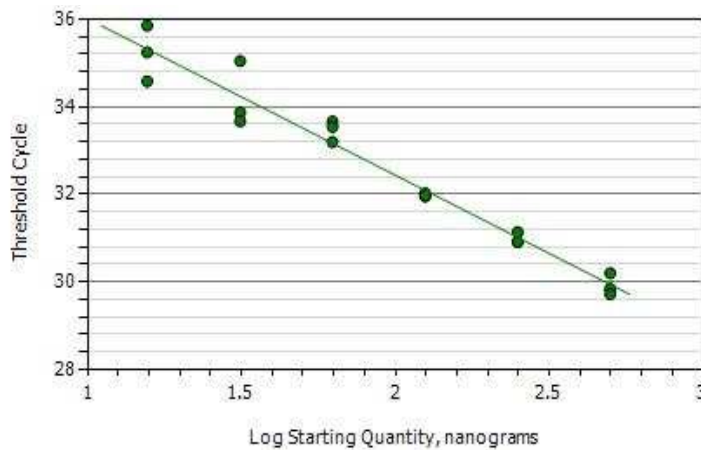
Um die individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten besser beleuchten zu können, wurde jeweils die FOXP3 Expression im Tumor mit der im korrespondierenden normalen Nierengewebe verglichen. Das Verhältnis zwischen der FOXP3 Expression im Tumorgewebe und der FOXP3 Expression im normalen Nierengewebe (T/N-Ratio) wurde anhand der gemessenen Ct-Werte berechnet.

Es wurde hierzu das effizienzkorrigierte Quantifizierungsmodell nach Pfaffl angewandt (siehe Kapitel 2.2.2.10). In einer Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannten Konzentrationen wurde zunächst die *real-time* PCR Effizienz für das Zielgen, FOXP3, sowie für das *Housekeeping* Gen, RPS9, ermittelt. Es konnte eine Effizienz für die Amplifikation von FOXP3 von 2,09 bestimmt werden. Die Effizienz für die Amplifikation des *Housekeeping* Gens lag bei 2,29. Abbildungen 20 und 21 zeigen die Standardkurven für die beiden Gene FOXP3 und RPS9.



$$E = 2^{\Delta Ct}$$

Abbildung 20 Standardkurve zur Ermittlung der *real-time* RT-PCR Effizienz für die Amplifikation des *Housekeeping* Gens RPS9. In einer Verdünnungsreihe mit Faktor 1:2 ausgehend von 500 ng wurden die Ct-Werte für 6 Verdünnungen ermittelt. Aus der mittleren Differenz der Ct-Werte zweier benachbarter Verdünnungen (ΔCt) konnte die Effizienz **E = 2,29** berechnet werden ($E = 2^{\Delta Ct}$).



$$E = 2^{\Delta Ct}$$

Abbildung 21 Standardkurve zur Ermittlung der *real-time* RT-PCR Effizienz für die Amplifikation des Zielgens FOXP3. In einer Verdünnungsreihe mit Faktor 1:2 ausgehend von 500 ng wurden die Ct-Werte für 6 Verdünnungen ermittelt. Die Effizienz betrug **E = 2,09**.

Mit der Berechnungsformel des effizienzkorrigierten Quantifizierungsmodells wurde nun das Verhältnis der FOXP3 Expression im Tumorgewebe und im normalen Nierengewebe berechnet. In dieser Formel werden die Unterschiede in der Effizienz des Zielgens und des *Housekeeping* Gens berücksichtigt und korrigiert.

Formel

$$\text{Ratio}_{T/N} = \frac{E^{\Delta Ct \text{ Zielgen (Normal - Tumor)}}}{E^{\Delta Ct \text{ Referenzgen (Normal - Tumor)}}$$

Die quantitative *real time* RT-PCR zeigte deutliche Gemeinsamkeiten mit den Ergebnissen der semi-quantitativen konventionellen RT-PCR. Nur drei Patienten (4, 11, 22) zeigten eine geringere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Das Verhältnis zwischen Expression im Tumorgewebe und Expression im normalen Nierengewebe lag bei Patient 4 bei 0,40; bei Patient 11 bei 0,52 und bei Patient 22 bei 0,90. 20 Patienten zeigten hingegen eine stärkere Expression des FOXP3 Gens im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Den deutlichsten Unterschied zeigte hierbei Patient 1 mit einer 29-mal stärkeren Expression von FOXP3 im Tumorgewebe gegenüber dem normalen Nierengewebe. Somit konnten die konventionelle und die quantitative PCR ähnliche Expressionen von FOXP3 nachweisen. 20 Patienten wiesen

in beiden Methoden eine vermehrte Expression von FOXP3 im Tumorgewebe gegenüber korrespondierendem Normalgewebe auf. Die Patienten 4 und 11 zeigten hingegen in beiden Methoden keine vermehrte Expression von FOXP3 im Tumorgewebe. Bei den Patienten 6 und 22 divergierten die Ergebnisse in konventioneller und quantitativer PCR. Hier war der quantifizierte Expressionsunterschied in Tumor- und Normalgewebe jedoch auch gering. (T/N Ratio 1,13 und 0,90). Abbildung 22 zeigt die logarithmische Darstellung der T/N-Ratio der 23 untersuchten Patientenproben.

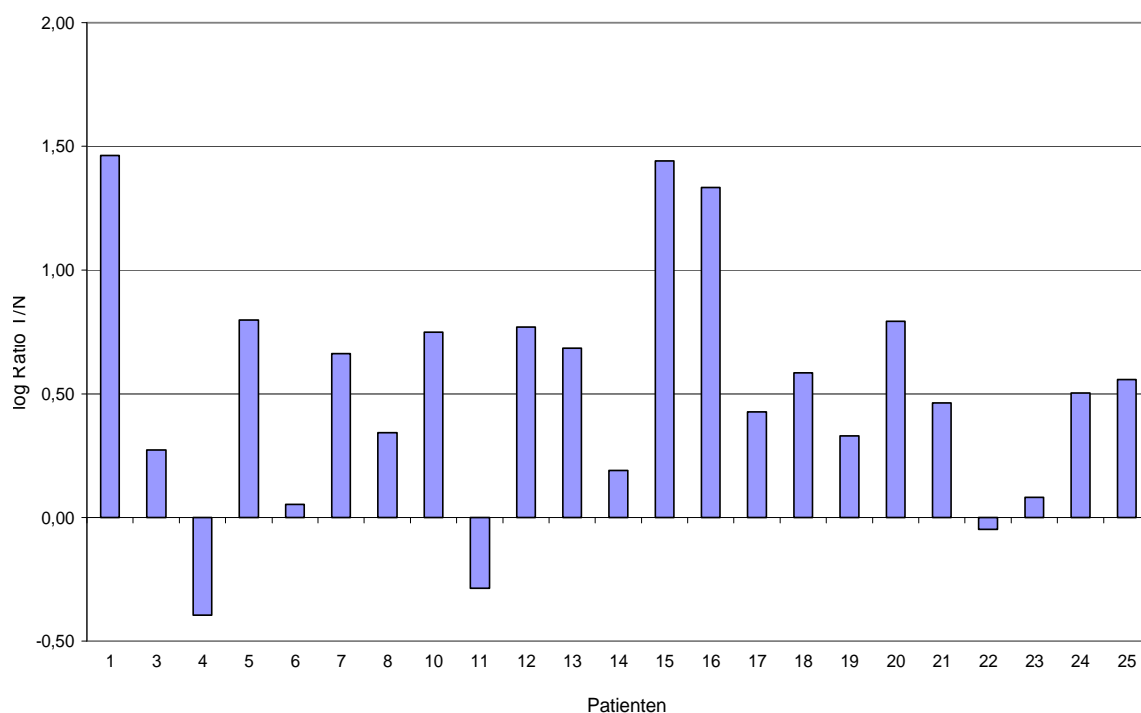


Abbildung 22 *Real time* RT-PCR zur Untersuchung der FOXP3 Expression in 23 Primärtumoren sowie angrenzendem normalen Nierengewebe. Die Werte der FOXP3 Expression wurden jeweils auf die Expression des *Housekeeping* Gens RPS9 bezogen. Das Verhältnis zwischen FOXP3 Expression im Tumor und im Normalgewebe (T/N-Ratio) ist logarithmisch dargestellt. Bis auf die Proben der Patienten 4, 11 und 22 zeigten alle Patienten eine stärkere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe als im angrenzenden normalen Nierengewebe. Die mittlere T/N-Ratio aller Patienten lag bei 6,08.

In Tabelle 14 sind die mit Hilfe der quantitativen *real time* RT-PCR ermittelten relativen FOXP3 Expressionsunterschiede zwischen Nierentumor- und Normalnierengewebe der 23 untersuchten Patienten noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 14 T/N Ratio der FOXP3 Genexpression bezogen auf das Haushaltsgen RPS9

Patient	T/N Ratio FOXP3		Patient	T/N Ratio FOXP3
1	29,01		15	27,62
3	1,88		16	21,55
4	0,40		17	2,67
5	6,29		18	3,83
6	1,13		19	2,14
7	4,60		20	6,21
8	2,21		21	2,90
10	5,62		22	0,90
11	0,52		23	1,20
12	5,89		24	3,19
13	4,84		25	3,60
14	1,55			

3.2.3 Vergleich der Ergebnisse von PCR und Immunhistochemie

Die molekularbiologischen und immunhistochemischen Ergebnisse der Genexpression von FOXP3 in Nierenzellkarzinomgewebe sowie korrespondierendem normalen Nierengewebe wurden miteinander verglichen. Es konnten Gemeinsamkeiten der Ergebnisse beider Methoden festgestellt werden. Von den 21 Patientenproben, die nach beiden Methoden untersucht wurden, zeigten 18 Proben sowohl in der PCR als auch in der Immunhistochemie eine vermehrte Expression von FOXP3 im Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe. Eine stärkere FOXP3 Expression im Normalgewebe fand sich bei einem Patienten (Patient 4). Dies ergaben auch hier sowohl die Ergebnisse der PCR als auch die der immunhistologischen Färbung. Lediglich bei zwei Patienten divergierten die Ergebnisse der beiden Methoden. So ergab die molekularbiologische Untersuchung bei Patient 7 eine stärkere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe als im Normalgewebe. Die immunhistochemische Färbung zeigte jedoch mehr FOXP3 positive Zellen im Normalgewebe als im Tumorgewebe. Bei Patient 22 zeigte sich in der immunhistochemischen Untersuchung eine stärkere Expression im Tumorgewebe, wohingegen die PCR eine geringfügig vermehrte Expression von FOXP3 im benachbarten Normalgewebe nachwies. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse beider Methoden bezüglich der Verteilung FOXP3 positiver Zellen in Tumor- und

Normalgewebe noch einmal zusammengefasst. Nur bei zwei Patienten (Patient 7 und 22) zeigen Immunhistochemie und PCR unterschiedliche Ergebnisse.

Tabelle 15 Verteilung FOXP3 positiver Zellen im Nierenzellkarzinom sowie angrenzendem gesunden Nierengewebe nach den beiden Methoden PCR und IHC. T = mehr positive Zellen im Tumor als im Normalgewebe, N = mehr positive Zellen im Normalgewebe als im Tumor.

Patient	IHC	PCR
1	T	T
4	N	N
5	T	T
6	T	T
7	N	T
8	T	T
10	T	T
12	T	T
13	T	T
14	T	T
15	T	T
16	T	T
17	T	T
18	T	T
19	T	T
20	T	T
21	T	T
22	T	N
23	T	T
24	T	T
25	T	T

3.3 Etablierung einer Parallelfärbung von CD4 und FOXP3

Wie in Kapitel 1.3 bereits diskutiert, ist FOXP3 zwar der bisher spezifischste Marker für regulatorische T-Zellen, jedoch wird er nicht ausschließlich in natürlichen regulatorischen T-Zellen exprimiert. Um die FOXP3⁺ Zellen genauer zu charakterisieren, wurde eine CD4-Färbung etabliert, die den membranständigen Oberflächenmarker CD4 nachweist. Als spezialisierte Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen exprimieren natürliche Tregs das Oberflächenmolekül CD4. Mit dem Ziel, regulatorische Zellen zu markieren, die sowohl FOXP3 als auch CD4 exprimieren, wurden die beiden Färbeprotokolle der Antikörper FOXP3 und CD4 anschließend aneinander angepasst, sodass eine Parallelfärbung der beiden Marker an zwei Gewebeschnitten auf einem Objektträger möglich war.

Die CD4-Färbung wurde zunächst nach dem Protokoll der FOXP3-Färbung durchgeführt. Die Anwendung des etablierten FOXP3 Protokolls auf den CD4 Antikörper (anti-human CD4, Vector) erbrachte jedoch kein Ergebnis. Es zeigte sich, dass das CD4-Oberflächenepitop sehr empfindlich ist und nur einen bestimmten pH Bereich toleriert. So zeigte eine Umstellung der Hitzebehandlung in Citrat bei pH 6 auf eine Hitzebehandlung der Proben in EDTA bei pH 8 deutlich bessere Ergebnisse (Abbildung 23).

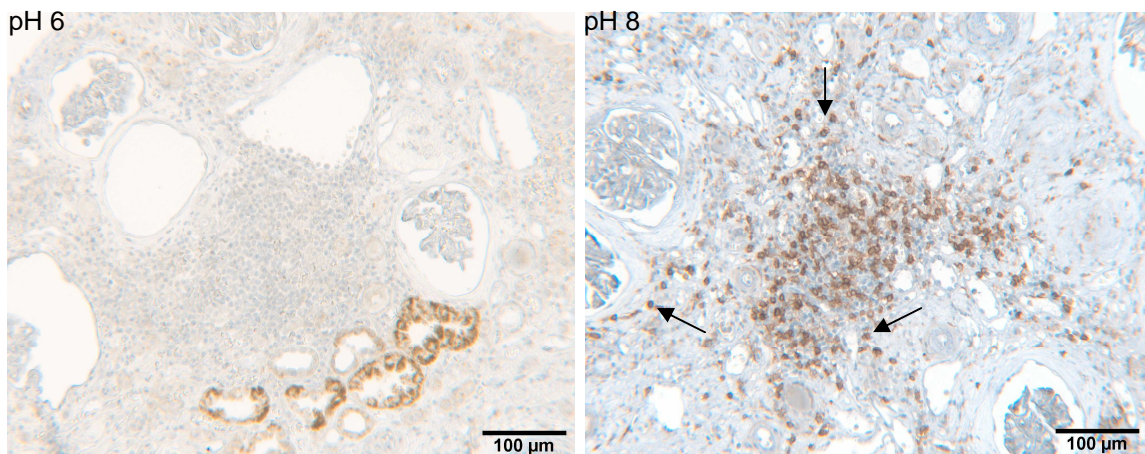


Abbildung 23 Etablierungsschritt der immunhistochemischen Färbemethode zum Nachweis des Oberflächenantigens CD4. Das für den Nachweis von FOXP3 etablierte Färbeprotokoll mit einer Hitzebehandlung im Citratbad bei pH 6 brachte bei Anwendung auf den CD4 Antikörper kein spezifisches Färbeergebnis (links). Das empfindliche Epitop CD4 toleriert nur einen bestimmten pH Bereich. Dies konnte die Umstellung der Vorbehandlung auf EDTA bei pH 8 zeigen, die zu spezifischen und kontrastreichen Reaktionen führte (Pfeil) (rechts). Gegenfärbung: Methylenblau.

Die Reduktion der Hintergrundreaktion in den Blutgefäßen konnte optimiert werden, nachdem die Inkubation mit Wasserstoffperoxid direkt im Anschluss an die Entparaffinierung erfolgte. Die ursprüngliche Inkubation nach der Hitzebehandlung erbrachte schlechtere Ergebnisse. Die in der Literatur empfohlene Zugabe von Methanol führte bei der Inkubation mit Wasserstoffperoxid zu keiner signifikanten Verbesserung. Analog zur Etablierung der FOXP3 Färbung erwies sich die unspezifische Reaktion in den Nierentubuli auch bei der Etablierung der CD4 Färbung als problematisch (Abbildung 24).

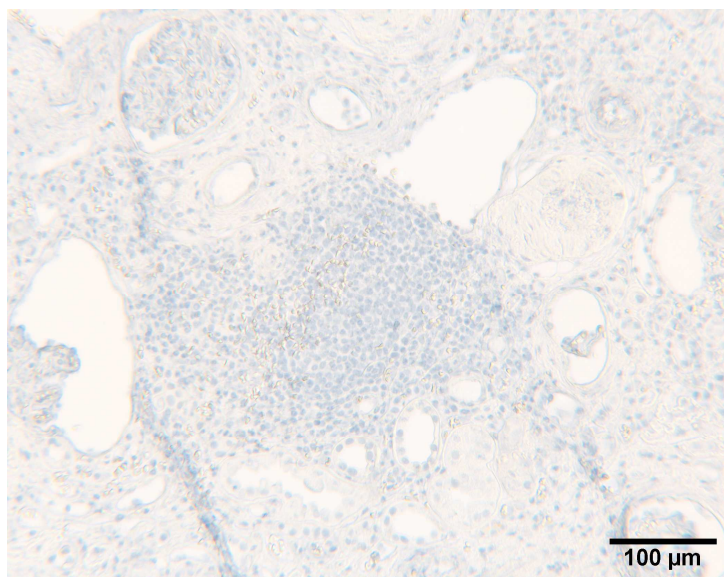
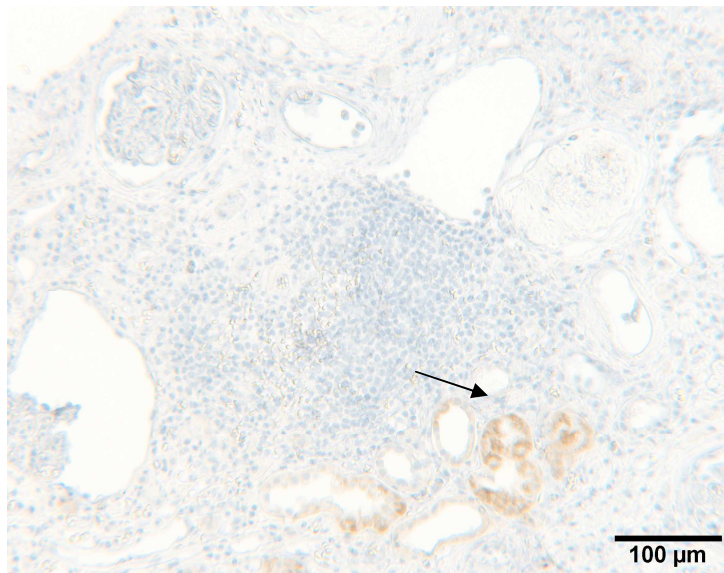
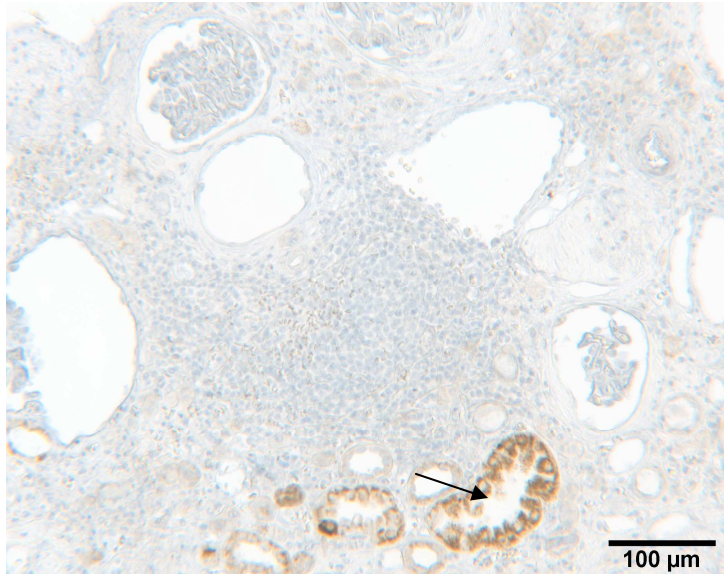


Abbildung 24 Etablierungsschritt der immunhistochemischen Färbemethode zum Nachweis des Oberflächenantigens CD4. Die Abbildung zeigt die ABC-Komplex abhängige unspezifische Hintergrundfärbung in den Nierentubuli. Während die beiden Negativkontrollen 2+3 eine Hintergrundreaktion zeigen (Pfeil), findet sich diese in der 4. Negativkontrolle nicht. Bei letzter kommt anders als bei den übrigen Negativkontrollen der ABC-Komplex nicht zum Einsatz.

Gegenfärbung: Methylenblau.

Oben: 2. Negativkontrolle

Mitte: 3. Negativkontrolle

Unten: 4. Negativkontrolle

Eine Inkubation mit den Blockierlösungen des Avidin/Biotin Blocking Kits zeigte wie auch bei der Etablierung der FOXP3-Färbung eine Reduktion der unspezifischen Färbung. Die Inkubationszeit wurde jedoch auf je 90 Minuten verlängert. Die unspezifische Färbung in den Nierentubuli konnte damit auch bei der CD4 Färbung deutlich reduziert werden. Diese Modifikationen des ursprünglichen FOXP3 Protokolls führten zu einem deutlichen und kontrastreichen, membranständigen Immunsignal CD4 positiver Zellen in der Niere sowie im Tumorgewebe (Abbildung 25).

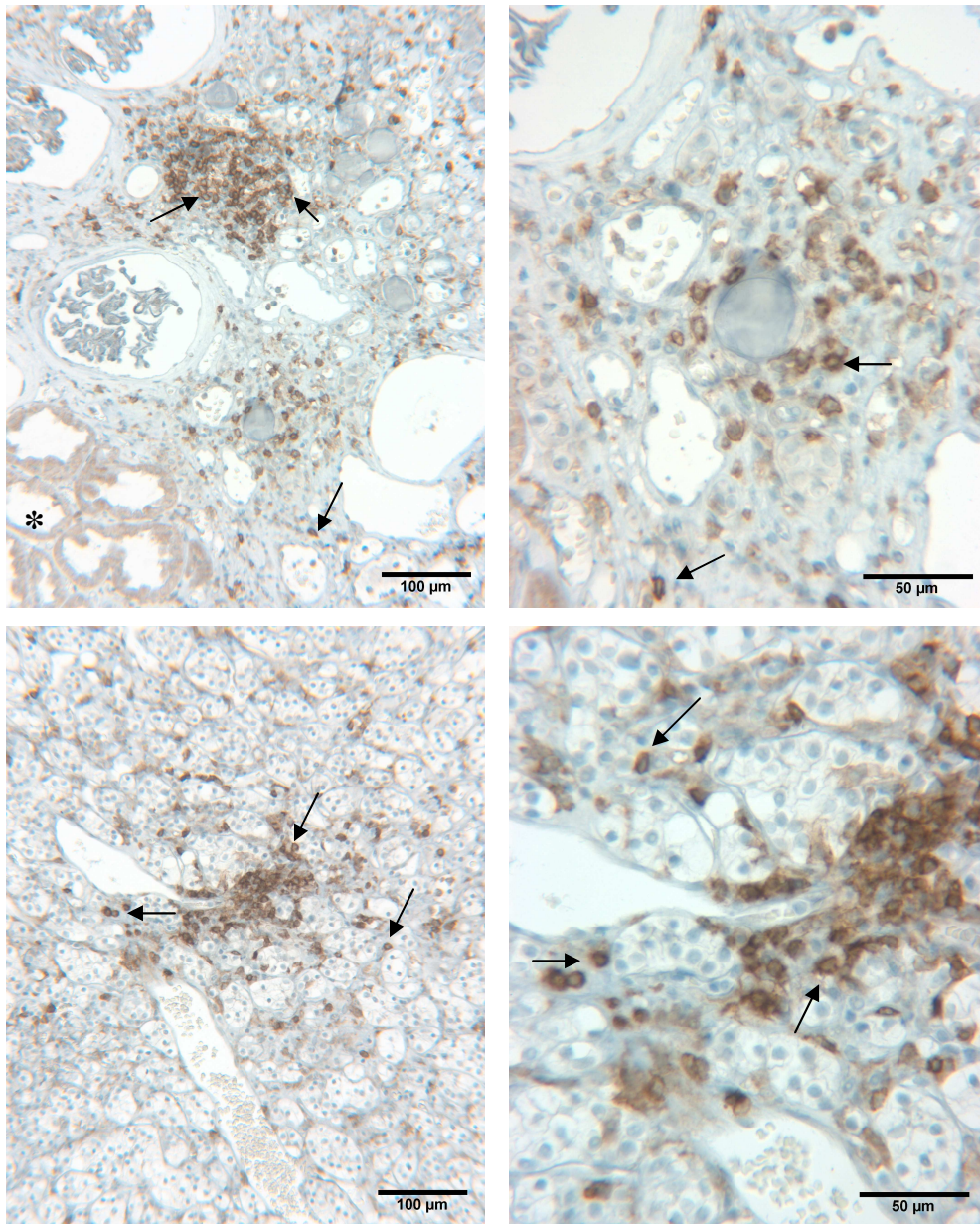


Abbildung 25 Immunhistochemische Färbung von CD4 nach dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokoll. Das Protokoll ermöglicht eine spezifische und kontrastreiche membranständige Färbung von CD4⁺ Zellen (Pfeil) sowohl in gesundem Nierengewebe (oben) als auch im Nierenzellkarzinom (unten). Eine unspezifische Reaktion in den Nierentubuli konnte durch Blockade von gewebebeständigem Biotin und Avidin deutlich reduziert, jedoch nicht vollständig beseitigt werden (Stern). Gegenfärbung: Methylenblau.

Um eine Parallelfärbung der beiden Marker durchführen zu können, wurde im Anschluss das Protokoll der FOXP3 Färbung auf das nun etablierte CD4 Protokoll umgestellt. Diese Umstellung des Protokolls verlief problemlos und führte zu deutlichen Immunsignalen FOXP3 positiver Zellen. Die Hitzebehandlung in EDTA zeigte gegenüber der Behandlung im Citratbad keinen Unterschied im Färbeergebnis. Auch die veränderte Reihenfolge der Wasserstoffperoxidinkubation sowie die verlängerten Inkubationszeiten von Avidin und Biotin erbrachten bei der Färbung von FOXP3 spezifische und kontrastreiche Signale.

Für die Parallelfärbung wurden zwei jeweils 4 µm dicke, im Paraffinblock direkt aufeinander folgende Gewebeschnitte nebeneinander auf einen Objektträger (OT) aufgezogen. Die etablierte Färbemethode ermöglicht nun die Markierung FOXP3⁺ sowie CD4⁺ Zellen auf direkt benachbarten Gewebeschnitten in einem gemeinsamen Färbevorgang. Durch die geringe Schnittdicke sind einige Zellen in beiden Gewebeschnitten angeschnitten und können so bezüglich ihres Färbeverhaltens direkt miteinander verglichen werden. Die etablierte Methode ermöglicht somit die Darstellung von Zellen, die sowohl FOXP3 als auch CD4 exprimieren. In Abbildung 26 ist die Parallelfärbung von FOXP3 und CD4 an zwei benachbarten Schnitten dargestellt.

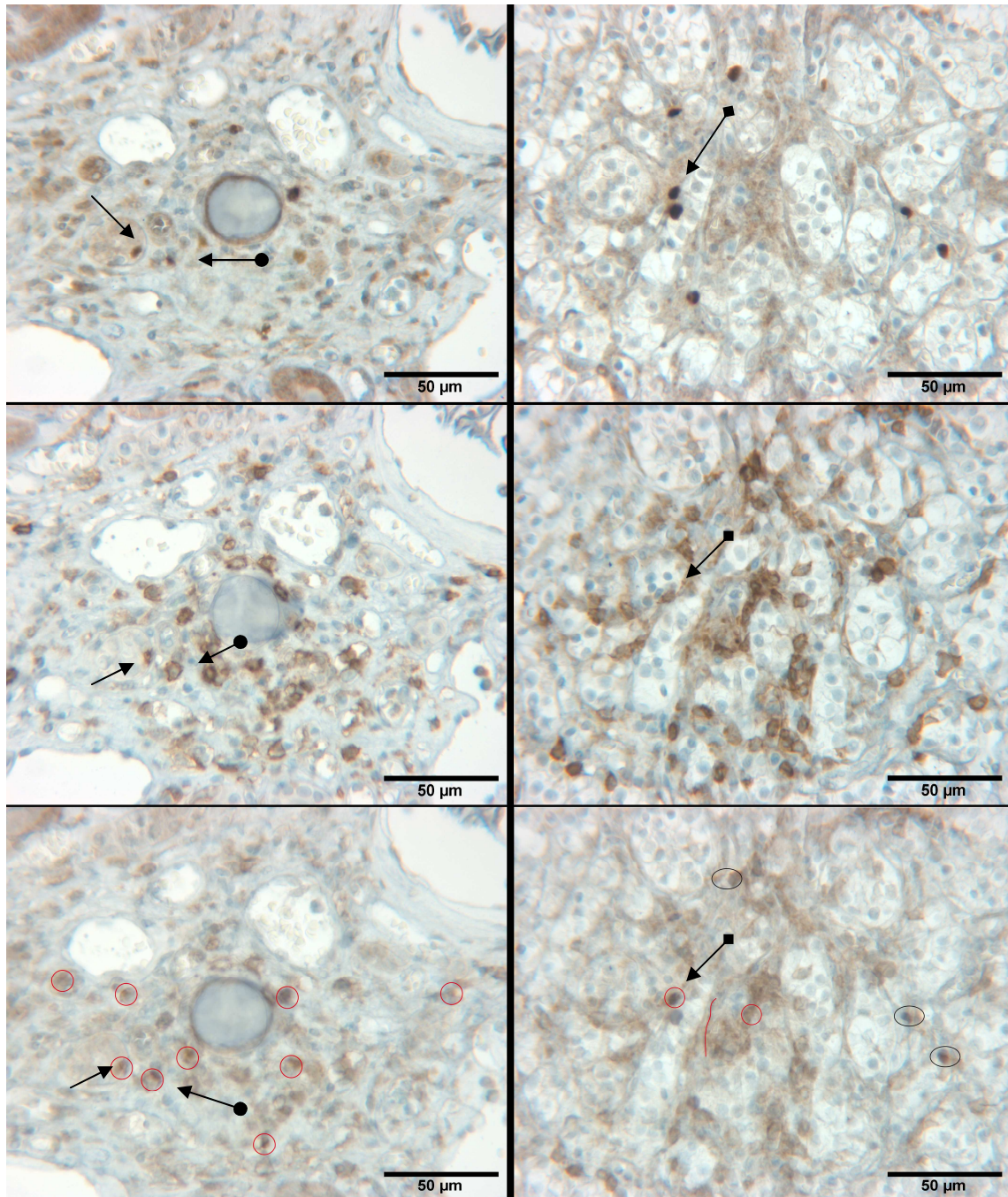


Abbildung 26 Parallelfärbung von FOXP3 und CD4 an zwei direkt benachbarten Schnitten in der Niere (linke Spalte) sowie im Tumor (rechte Spalte). Die oberste Reihe zeigt die spezifische Färbung von FOXP3⁺ Zellen (Pfeil) in der Niere (links) sowie im Tumor (rechts). In der zweiten Reihe ist die spezifische Färbung von CD4⁺ Zellen (Pfeil) ebenfalls in Niere (links) und Tumor (rechts) dargestellt. Dabei handelt es sich bei den Gewebeschnitten der FOXP3 und CD4 Färbung um jeweils 4 µm dicke im Organ direkt aufeinander folgende Schnitte. In der untersten Reihe sind die FOXP3 Färbungen der ersten Reihe und die CD4 Färbungen der zweiten Reihe virtuell übereinander gelegt worden. Das direkte Aufeinanderfolgen der Schnitte im Organ ermöglicht die Beurteilung einiger Zellen, die in beiden Präparaten angeschnitten sind. Der Vergleich zeigt, dass einige Zellen sowohl FOXP3⁺ als auch CD4⁺ sind (roter Kreis). Oben: FOXP3 Niere (links) und Tumor (rechts), Mitte: CD4 Niere (links) und Tumor (rechts), Unten: beide Marker Niere (links) und Tumor (rechts).

4 Diskussion

Die Inzidenz des Nierenzellkarzinoms ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen. Derzeit erkranken weltweit jedes Jahr mehr als 200.000 Menschen (American Cancer Society, 2006). Das Nierenzellkarzinom ist damit das dritthäufigste urologische Malignom und macht etwa 2-3% aller Krebserkrankungen überhaupt aus (Okon, 2008). Auch wenn durch den zunehmenden Einsatz von Ultraschalldiagnostik im Rahmen von Krebsvorsorgeuntersuchungen das Nierenzellkarzinom immer häufiger in einem früheren Stadium entdeckt wird, so weisen doch etwa 25 % aller Patienten zum Diagnosezeitpunkt bereits Lymphknoten- oder Fernmetastasen auf (Baldewijns *et al*, 2008). Die Prognose des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist generell schlecht. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit beträgt bei nachgewiesener Metastasierung nur etwa 10 %. Dies ist vor allem auf die beim Nierenzellkarzinom schlechte Wirksamkeit von Chemo-, Hormon- und Strahlentherapie zurückzuführen.

Nachdem die Immuntherapie mit Zytokinen (insbesondere Interleukin-2 und Interferon- α) Jahrzehnte lang die einzige medikamentöse Therapieoption des metastasierten Nierenzellkarzinoms darstellte, haben in den letzten Jahren neue Therapieansätze aus dem Bereich der zielgerichteten (*targeted*) Therapie Erfolge gezeigt. Eine Kuration ist im metastasierten Stadium jedoch weiterhin nicht möglich.

Ein zunehmendes Verständnis von tumorspezifischen Immunreaktionen führte zu weiteren Innovationen im Bereich der Tumor Immuntherapie. So konnte intensive Forschung in den letzten Jahrzehnten zeigen, dass regulatorische T-Zellen, als aktive Immunregulatoren, eine entscheidende therapeutische Zielstruktur in der immunologischen Krebstherapie darstellen könnten.

Regulatorische T-Zellen sind eine heterogene Gruppe spezialisierter T-Zellen, die aktiv die Immunantwort regulieren. Neben typischen Oberflächenmarkern wie CD25 und CD4 ist ihr bisher spezifischster phänotypischer Marker der nukleäre Transkriptionsfaktor FOXP3. Um den potentiellen Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die tumorspezifische Immunantwort im Nierenzellkarzinom genauer zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von FOXP3 auf molekularer Ebene sowie auf Proteinebene untersucht und eine vermehrte Expression von FOXP3 im Nierenzellkarzinomgewebe verglichen mit korrespondierendem

normalen Nierengewebe nachgewiesen. Hierzu wurde zunächst eine geeignete immunhistochemische Nachweismethode etabliert, mit der FOXP3⁺ Zellen in humanem Nierengewebe nun spezifisch und kontrastreich dargestellt werden können (Kapitel 3.1). Obgleich bereits Anfang der 70er Jahre erstmals beschrieben, gilt regulatorischen T-Zellen erst seit gut einem Jahrzehnt wieder die Aufmerksamkeit intensiver immunologischer Forschung. Große Fortschritte konnten hinsichtlich der Charakterisierung ihrer biologischen Struktur sowie der Beschreibung spezifischer Marker erzielt werden. Auch über ihre immunregulatorische Rolle in der Tumorummunologie und die Mechanismen ihrer suppressiven Eigenschaften wurden neue Erkenntnisse gemacht (Kapitel 1.3.2). Dennoch bleibt der exakte Wirkmechanismus regulatorischer T-Zellen inkomplett verstanden.

Allgemein regulieren regulatorische T-Zellen die Immunantwort, indem sie Effektor-T-Zellen, NK-Zellen sowie Antigen präsentierende Zellen supprimieren. Sie unterdrücken überschießende Immunreaktionen und tragen somit zum Erhalt des immunologischen Gleichgewichts bei. In den letzten Jahren wurde die Vermutung stärker, regulatorische T-Zellen könnten auch in Tumoren eine effektive Immunantwort durch eine Suppression des Immunsystems verhindern. 1999 konnten Onizuka *et al.* am Mausmodell zeigen, dass eine systemische Reduktion von CD25⁺ T-Zellen mittels monoklonaler Antikörper *in vivo* zu einer Unterdrückung verschiedener Tumorzelllinien führte (Onizuka *et al.*, 1999). CD25⁺ T-Zellen sind in naiven Mäusen zumeist auch CD4⁺ und FOXP3⁺.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden zahlreiche humane Tumorentitäten auf das Vorkommen regulatorischer T-Zellen untersucht. Woo und Kollegen zeigten erstmals ein vermehrtes Auftreten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in Patienten mit Lungen- oder Ovarialkarzinom und wiesen deren suppressive Funktion *in vitro* nach (Woo *et al.*, 2001). Eine erhöhte Anzahl CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen wurde außerdem im Blut von Patienten mit Mamma-Ca, Pankreas-Ca (Liyanage *et al.*, 2002), Oesophagus-Ca (Ichihara *et al.*, 2003), Magen-Ca, Kolon-Ca (Somasundaram *et al.*, 2002), hepatozellulärem Ca (Ormandy *et al.*, 2005), Leukämie, Lymphom (Karube *et al.*, 2004), Melanom (Viguier *et al.*, 2004) und auch im Nierenzellkarzinom (Griffiths *et al.*, 2007) beobachtet.

Griffiths *et al.* konnten ein vermehrtes systemisches Vorkommen von $CD4^+CD25^{\text{high}}$ Zellen mit suppressiver Funktion in Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigen. Mittels Flusszytometrie wiesen sie bei Tumorpatienten eine höhere Anzahl regulatorischer Zellen im peripheren Blut nach als bei einer Vergleichsgruppe von gesunden Probanden. In einer weiteren Untersuchung, in der sie zusätzlich den Marker FOXP3 bestimmten, wurde der Unterschied noch deutlicher (Griffiths *et al.*, 2007). Die Expression von FOXP3 differenziert regulatorische $CD4^+CD25^+$ Zellen von aktivierten T-Zellen, die ebenfalls große Mengen an CD25 exprimieren, und ist somit noch spezifischer für regulatorische T-Zellen. Zudem wiesen Griffiths *et al.* an Gefrierschnitten von Nierenzellkarzinomgewebe der Tumorpatienten erstmals das Vorkommen $CD4^+FOXP3^+$ Zellen in der direkten Tumorumgebung nach.

Diese Untersuchungen zeigten zwar bei Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich zu gesunden Probanden systemisch vermehrte Tregs, sie ließen jedoch hinsichtlich des Vorkommens von Tregs *in situ* keinen Vergleich zwischen Nierenzellkarzinom und gesundem Nierengewebe zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen regulatorischer T-Zellen im Nierenzellkarzinom weiter charakterisiert. Dabei wurde jeweils das Tumorgewebe der 32 untersuchten Patienten direkt mit dem aus derselben Niere stammenden normalen Nierengewebe verglichen. Die immunhistochemischen Untersuchungen von 30 Proben mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Nachweismethode des Treg Markers FOXP3 zeigten bei 26 Patienten ein vermehrtes Vorkommen von $FOXP3^+$ Zellen im Tumorgewebe, wohingegen nur 4 der Patienten mehr $FOXP3^+$ Zellen im normalen Nierengewebe aufwiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass im Nierenzellkarzinom neben der bereits beschriebenen vermehrten Anzahl regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut auch im Tumorgewebe selber vermehrt $FOXP3^+$ Zellen vorkommen – verglichen mit dem korrespondierenden normalen Nierengewebe.

Dies konnten auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen bestätigen. Die Expression des FOXP3 Gens wurde bei 23 Nieren- und Tumorproben zunächst mittels konventioneller PCR gemessen und im Anschluss der Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und korrespondierendem normalen Nierengewebe mittels *real time* RT-PCR quantifiziert. Dabei zeigten 20 Patienten eine stärkere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe. Sie war im Durchschnitt etwa 6-

fach höher als im korrespondierenden Normalgewebe. Nur 3 Patienten wiesen hingegen eine geringere FOXP3 Expression im Tumor- gegenüber dem Normalgewebe auf.

Um FOXP3⁺ Zellen im Nierenzellkarzinom weiter charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Parallelfärbung der beiden Marker FOXP3 und CD4 etabliert. Die Parallelfärbung an zwei dünnen direkt aufeinander folgenden Gewebeschnitten konnte zeigen, dass einige Zellen sowohl FOXP3 als auch CD4 zu exprimieren scheinen. Durch die geringe Schnittdicke der Gewebeschnitte können Zellen, die auf beiden Schnitten getroffen sind bezüglich ihres Färbeverhaltens miteinander verglichen werden. Die etablierte Parallelfärbung legt also die Vermutung nahe, dass die allermeisten FOXP3⁺ Zellen gleichzeitig CD4 exprimierten. Die Methode gerät hier jedoch an ihre Grenzen, da sich nicht mit absoluter Sicherheit sagen lässt, dass beide positiven Marker tatsächlich auf derselben Zelle liegen. Hier könnte eine Doppelfärbung definitiv zeigen, dass ein und dieselbe Zelle beide Marker exprimiert.

Die regulatorischen Eigenschaften CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen aus Tumorpatienten wurden in mehreren Arbeiten in funktionellen *in vitro* Tests untersucht (Cesana *et al*, 2006; Curiel *et al*, 2004; Griffiths *et al*, 2007; Jeron *et al*, 2009). Die Tumor-assoziierten Tregs wiesen dabei sowohl funktionell als auch phänotypisch große Ähnlichkeiten mit regulatorischen T-Zellen aus gesunden Probanden auf. Sie zeigten deutlich suppressive Eigenschaften. Tumor-assoziierte Tregs hemmten die Proliferation CD4⁺CD25⁻ T-Zellen und führten zu einer verminderten Produktion von IL-2 und Interferon- γ . Es handelte sich also um funktionelle regulatorische T-Zellen.

Diese Untersuchungen mehrerer Autoren lassen vermuten, dass es sich auch bei den in dieser Arbeit nachgewiesenen FOXP3⁺ Zellen tatsächlich um regulatorische T-Zellen handelt. Curiel und Mitarbeiter zeigten im Ovarialkarzinom, dass alle tumorinfiltrierenden FOXP3⁺ Zellen gleichzeitig CD25 exprimieren (Curiel *et al*, 2004). In weiteren Studien wurde die Expression von FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit nachgewiesener regulatorischer Funktion beschrieben (Dannull *et al*, 2005; Griffiths *et al*, 2007). FOXP3 gilt derzeit als spezifischster Marker regulatorischer T-Zellen. Eine definitive Aussage über die regulatorischen Eigenschaften, lassen letztlich jedoch nur funktionelle Tests zu.

Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen in der Tumorummunologie wurde weiterhin deutlich, als einige Studien zeigen konnten, dass ein vermehrtes Auftreten von regulatorischen T-Zellen in Tumorkranken mit einer reduzierten Überlebensdauer der Patienten einherging.

Curiel *et al.* publizierten 2004 eine Studie mit 104 Patientinnen mit Ovarialkarzinom und zeigten, dass ein vermehrtes Vorkommen regulatorischer T-Zellen in der Tumorumgebung mit einem kürzeren Überleben der Patientinnen assoziiert war. Sie bildeten drei Patientengruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Anzahl tumorinfiltrierender Tregs und wiesen eine signifikant kürzere Überlebensdauer der Patientinnen in der Gruppe mit hoher Anzahl regulatorischer Zellen gegenüber der Gruppen mittlerer und niedriger Anzahl nach (Curiel *et al.*, 2004). Griffiths und Kollegen zeigten in einer Studie mit Nierenzellkarzinom-Patienten, dass auch dort eine Akkumulation regulatorischer T-Zellen im Tumor mit kürzerem Überleben der Patienten einherging (Griffiths *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen legten einen Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die tumorspezifische Immunantwort nahe.

Nachdem Untersuchungen an Mäusen bereits gezeigt hatten, dass eine systemische Reduktion von CD25⁺ T-Zellen mittels monoklonaler Antikörper *in vivo* zu einer Unterdrückung verschiedener Tumorzelllinien führte (Onizuka *et al.*, 1999), zeigten Danull und Kollegen eindrucksvoll, dass ähnliches auch für den menschlichen Organismus zu gelten scheint. Sie konnten durch die systemische Reduktion regulatorischer T-Zellen in Patienten mit Nierenzellkarzinom eine verbesserte Immunantwort evozieren (Dannull *et al.*, 2005). Die Therapie mit dem Ligand-Toxin Fusionsprotein Denileukin diftitox führte zu einer spezifischen Dezimierung regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut der Empfänger. Die Patienten, die anschließend mit dendritischen Zellen, welche mit Tumor-RNA transfiziert waren, geimpft wurden, zeigten eine verbesserte tumorspezifische Immunantwort als Patienten, die die Impfung allein erhalten hatten.

Regulatorische T-Zellen scheinen also die Expansion des Tumors aktiv zu unterstützen, indem sie eine spezifische Immunantwort unterdrücken.

Verschiedene Mechanismen, durch die regulatorische T-Zellen ihre suppressive Funktion ausüben, konnten bereits beschrieben werden. Neben der Inhibition von effektorischen T-Zellen durch die Freisetzung von TGF- β und IL-10 (Chen *et al.*, 2005;

Peng *et al.*, 2004), können Tregs über Perforin und Granzym-B abhängige Signalwege APCs und T-Effektorzellen direkt abtöten (Gondek *et al.*, 2005). Tregs konkurrieren zudem mit effektorischen T-Zellen um das inflammatorische Zytokin Interleukin-2 und hemmen somit deren Proliferation und Differenzierung (Barthlott *et al.*, 2005). Weitere Mechanismen der T-Zell Inhibition werden über Adenosin (Deaglio *et al.*, 2007), IDO (Fallarino *et al.*, 2003) und B7-H4 (Kryczek *et al.*, 2006) vermittelt.

In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Jeron und Kollegen (Jeron *et al.*, 2009) wurde das Genexpressionsmuster von tumorassoziierten Tregs im Nierenzellkarzinom mit dem von Tregs einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Autoren konnten in tumorassoziierten Tregs eine signifikante Dysregulation von Genen zeigen, die mit Apoptose oder der Kontrolle des programmierten Zelltods assoziiert sind. So war beispielsweise das proapoptotische Gen BAX (*BCL2-associated X-protein*) in Tregs aus Tumorpatienten signifikant downreguliert. Dies könnte durch verminderte apoptotische Stimuli ein längeres Überleben und damit vermehrtes Auftreten regulatorischer T-Zellen im Nierenzellkarzinom begünstigen. Auch konnte eine Upregulation von LGALS3 beobachtet werden. LGALS3 ist ein nach extrazellulär sezerniertes proapoptotisches Protein, das in effektorischen T-Zellen die Apoptose begünstigt. So könnten tumorinfiltrierende Tregs im Nierenzellkarzinom die tumorspezifische Immunantwort durch tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) supprimieren.

Diese Daten demonstrieren neben den Ergebnissen von Danull *et al.* erneut die bedeutende Rolle regulatorischer T-Zellen in den immunologischen Vorgängen im Nierenzellkarzinom.

Unter diesem Aspekt scheint interessant, dass in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Akkumulation regulatorischer T-Zellen im Grenzgebiet des Tumors zum normalen Nierengewebe beobachtet werden konnte. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate unter dem Mikroskop ermöglichte die Lokalisation der FOXP3⁺ Zellen im Gewebe. So zeigten sich bei 27 der 30 untersuchten Patienten mehr FOXP3⁺ Zellen im Grenzgebiet zwischen Tumor- und Normalgewebe. Nur bei 3 Proben konnten mehr FOXP3⁺ Zellen mitten im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Bei genauerer Unterteilung des Grenzgebietes zwischen Tumor- und Normalgewebe in ein Randgebiet im Tumor (RT) und ein Randgebiet im Normalgewebe (RN) zeigte sich kein

signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verteilung regulatorischer T-Zellen. Sie kamen also in beiden Randgebieten vermehrt vor.

Diese in der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene Beobachtung könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass regulatorische T-Zellen die Tumorexpansion *in situ* begünstigen. Gerade im Grenzgebiet zum normalen Nierengewebe muss der Tumor besonders aggressiv sein, um gegen eine potentielle Immunantwort des Organismus zu bestehen und weiter zu expandieren. Hier findet die Konfrontation zwischen den fremden Tumorzellen und spezifischen Immunzellen statt, die versuchen die Tumorzellen zu eliminieren. Dies könnte eine Akkumulation regulatorischer T-Zellen gerade im Grenzgebiet zwischen Tumor- und Normalgewebe erklären.

Nun stellt sich die Frage, ob Tumore ein vermehrtes Vorkommen regulatorischer T-Zellen in ihrer Umgebung begünstigen, um einer Immunantwort zu entgehen oder ob vielmehr eine erhöhte Zahl von Tregs erst zur Entstehung von Krebs führt.

Immer mehr Erkenntnisse scheinen zu zeigen, dass Tumore eine Akkumulation von regulatorischen T-Zellen in ihrer Umgebung aktiv begünstigen. So konnten Curiel und Kollegen im Ovarialkarzinom zeigen, dass Tregs unter dem Einfluss des Chemokin-Liganden CCL22 in die Tumorumgebung einwandern (Curiel *et al*, 2004). CCL22 wird im Ovarialkarzinom von Tumorzellen sowie Makrophagen im Tumormilieu produziert und bindet an den auf regulatorischen T-Zellen exprimierten Rezeptor CCR4. Auch begünstigt das im Tumormilieu vermehrt vorhandene Zytokin TGF- β eine Konversion naiver $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu regulatorischen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (Fantini *et al*, 2004). Interleukin-10, ebenfalls in der Umgebung von Tumoren erhöht, induziert die IL-10 produzierenden regulatorischen Tr1-Zellen (Groux *et al*, 1997). Zudem zeigte eine weitere Studie, dass sich nach Entfernung eines hepatozellulären Karzinoms die zunächst vermehrte Anzahl regulatorischer T-Zellen wieder normalisierte (Ormandy *et al*, 2005). Diese Erkenntnisse lassen eine durch den Tumor selbst begünstigte Tumordinfiltration regulatorischer T-Zellen vermuten.

Im Hinblick auf zukünftige Therapieoptionen des Nierenzellkarzinoms, zeigen diese Erkenntnisse neue Möglichkeiten auf. Neben der bereits beschriebenen systemischen Reduktion zirkulierender regulatorischer T-Zellen, könnten auch tumorinfiltrierende Tregs eine entscheidende therapeutische Zielstruktur darstellen.

Im Ovarialkarzinom gelang es bereits durch eine Blockade des Chemokin-Liganden CCL22 eine verminderte Tumordinfiltration durch Tregs zu erzielen (Curiel *et al*, 2004).

Regulatorische T-Zellen könnten demnach in Zukunft einen wichtigen Baustein in der immunologischen Krebstherapie darstellen. Ihre genauen Funktionsweisen weiter zu charakterisieren bleibt also eine der großen Aufgaben der modernen Tumorforschung.

5. Zusammenfassung

Regulatorische T-Zellen tragen als aktive Immunregulatoren wesentlich zum Erhalt des immunologischen Gleichgewichts bei. Durch immunsuppressive Mechanismen induzieren sie Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen und schützen den Organismus so vor Autoimmunität und überschießender Immunreaktion.

Intensive Forschung der letzten Jahre hat jedoch zu der Vermutung geführt, dass regulatorische T-Zellen auch immunologische Vorgänge in malignen Erkrankungen supprimieren könnten. In mehreren Studien konnte ein vermehrtes Vorkommen regulatorischer T-Zellen in Karzinompatienten nachgewiesen und mit reduziertem Überleben korreliert werden. Auch in Patienten mit Nierenzellkarzinom scheinen regulatorische T-Zellen in der Anzahl erhöht zu sein.

Viele Fragen hinsichtlich der Lokalisation und Verteilung, der genauen Charakterisierung und der spezifischen Funktionsmechanismen regulatorischer T-Zellen bleiben jedoch weiterhin unbeantwortet.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors FOXP3, der derzeit als spezifischster Marker regulatorischer T-Zellen gilt, im Nierenzellkarzinom untersucht. Dabei wurde die Expression bei 32 Patienten in Tumorgewebe und angrenzendem normalen Nierengewebe derselben Niere untersucht und verglichen. Zur Anwendung kamen folgende Methoden: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode, RNA-Isolation und -Analytik, Reverse Transkription, konventionelle und quantitative RT-PCR.

Zunächst konnte eine immunhistochemische Nachweismethode von FOXP3 in Nierenzellkarzinom- und normalem Nierengewebe erfolgreich etabliert werden. In 26 von 30 immunhistochemisch untersuchten Tumor- bzw. Nierenproben konnte ein vermehrtes Vorkommen FOXP3⁺ Zellen im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Nur vier Patienten zeigten im Tumorgewebe weniger FOXP3⁺ Zellen als im korrespondierenden Normalgewebe.

Auch die molekularbiologischen Untersuchungen konnten eine vermehrte Expression von FOXP3 im Tumor- verglichen mit normalem Nierengewebe nachweisen. Dabei bestätigte die quantitative *real time* PCR die Ergebnisse der konventionellen PCR. Von

23 untersuchten Tumor- bzw. Nierenproben wurde bei 20 Patienten eine stärkere Expression von FOXP3 im Tumorgewebe nachgewiesen. Sie war im Durchschnitt etwa 6-fach höher als die Expression von FOXP3 im korrespondierenden normalen Nierengewebe.

Somit konnte gezeigt werden, dass FOXP3⁺ Zellen im Nierenzellkarzinom verglichen mit normalem Nierengewebe vermehrt vorkommen.

Ferner wurde eine Akkumulation FOXP3⁺ Zellen im Grenzgebiet zwischen Tumor- und Normalgewebe beobachtet. 27 der 30 immunhistochemisch untersuchten Tumor- bzw. Nierenproben zeigten mehr FOXP3⁺ Zellen im Grenzgebiet zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe als mitten im Gewebe. Keine Tendenz konnte jedoch bei der Unterteilung des Grenzgebietes zwischen Tumor- und Normalgewebe in ein Randgebiet im Tumor (RT) und ein Randgebiet im Normalgewebe (RN) gezeigt werden.

Um die FOXP3⁺ Zellen genauer charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zudem eine immunhistochemische Färbemethode zum Parallelnachweis der beiden Marker FOXP3 und CD4 entwickelt. Der Parallelnachweis von CD4 und FOXP3 ermöglicht eine genauere Charakterisierung der untersuchten Zellen. Weitere Arbeiten könnten darauf aufbauend eine Doppelfärbung entwickeln, die eine definitive Koexpression beider Marker zeigen würde. Die regulatorische Funktion CD4⁺FOXP3⁺ Zellen wurde in verschiedenen Arbeiten bereits beschrieben. In weiteren Untersuchungen könnte auf der beschriebenen Methode aufbauend das Vorkommen regulatorischer T-Zellen im Nierenzellkarzinom weiter charakterisiert werden.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit der Treg Marker FOXP3 sowohl molekularbiologisch als auch auf Proteinebene im Nierenzellkarzinom verglichen mit normalem Nierengewebe vermehrt nachgewiesen werden. Eine deutliche Akkumulation FOXP3⁺ T-Zellen wurde im Grenzgebiet zwischen Tumor- und normalem Nierengewebe beschrieben. Basierend auf diesen Ergebnissen könnten weitere fokussierte Untersuchungen regulatorischer T-Zellen im Nierenzellkarzinom folgen. Diese sollten die weitergehende Bedeutung der Akkumulation FOXP3⁺ Zellen in der Grenzregion zwischen Tumor- und Normalgewebe im Zusammenhang mit ihrer Funktion beleuchten. Anhand funktioneller Tests sollten die regulatorischen Eigenschaften der FOXP3⁺ Zellen eindeutig nachgewiesen werden.

Letztlich bleibt es eine der großen Herausforderungen der immunologischen Tumorforschung, regulatorische T-Zellen in den verschiedenen Tumorentitäten weiter zu charakterisieren. Die bisherigen Ergebnisse vieler Autoren lassen mit der spezifischen Manipulation regulatorischer T-Zellen auf neue therapeutische Möglichkeiten hoffen.

Summary

Regulatory T cells are crucial for inducing and maintaining tolerance to self-antigens and thereby protect the organism from autoimmunity and overwhelming immune response. Extensive studies over the past few years, however, suggest that regulatory T cells negatively affect tumour immunity and contribute to tumour growth. Currently FOXP3 (transcription factor forkhead box P3) is accepted to be the most specific and reliable marker for regulatory T cells in men.

In the present work we investigated the presence of FOXP3 positive cells in patients with renal cell cancer and characterized their distribution. Using polymerase chain reaction (PCR) to detect and quantify FOXP3 expression we were able to demonstrate that FOXP3 is stronger expressed in renal cell cancer compared to normal renal tissue from the same patient. Within 23 investigated patients 20 patients (86,96%) showed stronger expression of FOXP3 in cancer tissue whereas only 3 patients (13,04%) presented lower expression of FOXP3 in renal cell cancer compared to normal renal tissue. FOXP3 expression was on average 6 times higher in cancer tissue than in normal renal tissue of the same patient.

For immunohistochemical investigation of FOXP3 expressing cells we established a staining method that could identify FOXP3 positive cells specifically and rich in contrast. Immunohistochemical staining of FOXP3 could also reveal increased numbers of FOXP3 expressing cells in renal cell cancer compared to normal renal tissue. Out of 30 patients 26 patients (86,67%) showed higher numbers of FOXP3 expressing cells in the tumor compared to normal renal tissue. We could show that FOXP3 positive cells accumulate in the extremity of the tumour next to the normal renal tissue. In 27 patients (90%) FOXP3 positive cells could be found in higher numbers in the extremity of the tumor marginal to normal renal tissue. In only 3 patients (10%) an accumulation of FOXP3 expressing cells was detected amidst tumor tissue.

These findings contribute to a further characterization of regulatory T cells in renal cell cancer and may have implications in future strategies to target regulatory T cells being one therapeutic option for fighting cancer.

Protokolle

1. Färbeprotokoll zur Detektion von FOXP3

VORBEREITUNG- Ansetzten von Chemikalien

Citratpuffer

Zum Ansetzen des Citratpuffers wurden 2,1 g Citrat abgewogen und in einer Laborflasche von einem Liter Fassungsvermögen mit Aqua bidest aufgeegossen. Durch Titration mit NaOH wurde ein pH-Wert von 6,1 eingestellt.

Ammoniumchlorid-Lösung

Zum Herstellen der 0,1 molaren Ammoniumchlorid-Lösung wurden 5,35 g Ammoniumchlorid abgewogen und in einer Laborflasche mit einem Liter Aqua bidest vermengt.

PBS-Puffer (Phosphatpuffer)

100 ml 10x PBS wurden mit 900 ml Aqua bidest angesetzt.

BSA-Lösung

50 ml PBS wurden mit 2% BSA (Rinder-Serum Albumin) angesetzt

DURCHFÜHRUNG:

1. Entparaffinierung

- 2x10 min in Xylol waschen (RT)
- 2x10 min in 100%igem Ethanol waschen
- je 5 min in 96%igem, 90%igem, 70%igem Ethanol waschen

2. Waschen

- 5 min in Aqua bidest waschen
- 5 min in Citrat-Puffer waschen

3. Mikrowellenbehandlung

- 3x5 min in Citrat-Puffer in der Mikrowelle (700 Watt) erhitzen
- gegebenenfalls verdunsteten Citrat-Puffer auffüllen

4. Waschen

- 15 min bei RT abkühlen lassen
- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

5. Blockierung der Aldehyde

- 15 min in Ammoniumchlorid inkubieren

6. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

7. Blockierung der endogenen Peroxidase

- 15 min in 0,3 %igen Wasserstoffperoxid inkubieren

8. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

9. Präinkubation

- 60 min in PBS mit 3%igem Normal-rabbit-Serum und 2%igem BSA inkubieren

10. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

11. Blockierung von Avidin

- 15 min mit Avidin-Blockierlösung inkubieren

12. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

13. Blockierung von Biotin

- 15 min mit Biotin-Blockierlösung inkubieren

14. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

15. Inkubation (1. Antikörper)

- in PBS mit 1 %igem Normal-rabbit-Serum, 2 %igem BSA und anti-human FOXP3 (1:150) über Nacht inkubieren

16. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

17. Inkubation (2. Antikörper)

- 60 min in PBS mit 1,5 %igem Normal-rabbit-Serum, 2 %igem BSA und rabbit-anti-rat (1:200) inkubieren

18. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

19. ABC-Reaktion

- 60 min in ABC-Lösung inkubieren

20. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen
- kurz in Tris/HCL schwenken
- 5 min in Tris/HCL waschen

21. DAB-Reaktion

- 30 min in DAB-Lösung inkubieren
- [200 ml Tris/HCL + 5 Tabletten DAB + 600µl 3 %iges Wasserstoffperoxid]

22. Waschen

- in kaltem Tris/HCL schwenken
- 5 min in kaltem Tris/HCL waschen
- in kaltem Aqua bidest schwenken
- 5 min in kaltem Aqua bidest waschen

23. Gegenfärbung

24. Dehydratisierung

- je 5 min in 70 %igem, 90 %igem, 96%igem Ethanol waschen
- 2x5 min in 100 %igem Ethanol waschen
- 3x10 min in Xylol waschen
- eindeckeln mit Entellan

2. Protokoll zur Parallelfärbung von CD4 und FOXP3

VORBEREITUNG- Ansetzen von Chemikalien

Ammoniumchlorid-Lösung

Zur Herstellung der 0,1 molaren Ammoniumchlorid-Lösung wurden 5,35 g Ammoniumchlorid abgewogen und in einer Laborflasche mit einem Liter Aqua bidest vermengt.

PBS-Puffer

100ml 10x PBS wurden mit 900 ml Aqua bidest angesetzt.

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

Zur Herstellung der 1mM EDTA-Lösung wurden 0,292 g EDTA abgewogen und mit einem Liter Aqua bidest vermengt.

BSA-Lösung

50 ml PBS wurden mit 2% BSA angesetzt.

DURCHFÜHRUNG

1. Entparaffinierung

- 15 min in Xylol waschen
- 7 min in Xylol waschen
- Je 5 min in 96 %igem, 80%igem, 70%igem und 60%igem Ethanol waschen
- 3 min in Aqua bidest waschen
- Über Nacht in Aqua bidest aufbewahren

2. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

3. Blockierung der endogenen Peroxidase

- 15 min in 0,3 %igem Wasserstoffperoxid inkubieren

4. Waschen

- kurz in PBS schwenken
- 2x5 min in PBS waschen

5. Hydrolyse

- 5 min in 1mM EDTA waschen
- 5x5 min in 1mM EDTA in der Mikrowelle (700 Watt) erhitzen
 - Nach jedem Erhitzen jeweils 5 min abkühlen lassen

6. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

7. Blockierung der Aldehyde

- 5 min in Ammoniumchlorid inkubieren

8. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 5 min in PBS waschen

9. Präinkubation

- 4 h in PBS mit 6 %igem Normal-horse-Serum (CD4) bzw. Normal-rabbit-Serum (FOXP3) und 2 % BSA inkubieren

10. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 4x5 min in PBS waschen

11. Blockierung von Avidin

- 90 min mit Avidin-Blockierlösung inkubieren

12. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 2x5 min in PBS waschen

13. Blockierung von Biotin

- 90 min mit Biotin-Blockierlösung inkubieren

14. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 2x5 min in PBS waschen

15. Inkubation (1. Antikörper)

- In PBS mit 1% Normal-horse-Serum bzw. Normal-rabbit-Serum, 5% Biotin-Blockierlösung und 2% BSA über Nacht bei 4 °C inkubieren (1:300)

16. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 2x5 min in PBS waschen

17. Inkubation (2. Antikörper)

- 60 min in PBS mit 1,5% Normal-goat-Serum, 2% BSA und 2. Antikörper (1:200) inkubieren

18. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 2x5 min in PBS waschen

19. ABC-Reaktion

- 45 min in ABC-Lösung inkubieren

20. Waschen

- Kurz in PBS schwenken
- 2x5 min in PBS waschen
- kurz in Tris/HCL schwenken
- 10 min in Tris/HCL waschen

21. DAB-Reaktion

- 15 min in DAB-Lösung inkubieren
 - 200 ml Tris/HCL + 5 Tabletten DAB + 600 µl 3%iges Wasserstoffperoxid

22. Waschen

- in kaltem Tris/HCl schwenken (4°C)
- 5 min in kaltem Tris/HCl waschen (4°C)
- 5 min in kaltem Aqua bidest waschen (4°C)
- in Aqua bidest schwenken (RT)

23. Gegenfärbung

24. Dehydratisierung

- 1 min in 96 %igem Ethanol waschen
- 2 min in 96 %igem Ethanol waschen
- 5 min in 100 %igem Ethanol waschen
- 5 min in Xylol waschen
- Eindeckeln mit Entellan

Abkürzungs-, Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AIRE	<i>autoimmune regulator</i>
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BAX	<i>BCL2-associated X-protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
BTLA	<i>B- and T-lymphocyte attenuator</i>
C	Celsius
CA	Karzinom
CCL22	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 22
CCR4	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor 4
CCR7	<i>chemokine (c-c motif) receptor 7</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ct	<i>threshold cycle</i>
CT	Computer Tomographie
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
d	desoxy-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
FU	Fluorouracil
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
h	Stunde(n)
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
hs	<i>human species</i>
ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
m	männlich
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSKCC	<i>Memorial Sloan-Kettering Cancer Center</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>

NK	Natürliche Killerzelle
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Optische Dichte
OT	Objektträger
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
TAA	Tumor assoziiertes Antigen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-Puffer mit NaCl
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell-receptor</i>)
TGF- β	<i>Transforming growth factor -β</i>
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	von Hippel-Lindau
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	WHO Klassifikation der epithelialen Nierentumoren (Eble <i>et al</i> , 2004)	5
Tabelle 2	Gradeinteilung des Nierenzellkarzinoms nach S. Fuhrmann (Fuhrman <i>et al</i> , 1982)	6
Tabelle 3	TNM-Klassifikation nach UICC (2002)	7
Tabelle 4	Stadieneinteilung entsprechend des AJCC	7
Tabelle 5	Patientencharakteristika	32
Tabelle 6	Geräte	33
Tabelle 7	Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 8	Chemikalien und Enzyme	34
Tabelle 9	Antikörper	36
Tabelle 10	Normalseren und Kits	36
Tabelle 11	Molekularbiologische Kits	36
Tabelle 12	Verwendete Primer zur Amplifikation der Housekeeping Gene (RPS9, HPRT1R)	37
Tabelle 13	Verwendeter Primer zur Amplifikation des Zielgens FOXP3	37
Tabelle 14	T/N Ratio der FOXP3 Genexpression bezogen auf das Haushaltsgen RPS9	77
Tabelle 15	Verteilung FOXP3 positiver Zellen im Nierenzellkarzinom sowie angrenzendem gesunden Nierengewebe nach den beiden Methoden PCR und IHC. T = mehr positive Zellen im Tumor als im Normalgewebe, N = mehr positive Zellen im Normalgewebe als im Tumor.	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schätzung der altersspezifischen Inzidenz des Nierenzellkarzinoms In Deutschland.....	2
Abbildung 2 Subpopulationen regulatorischer T-Zellen.....	19
Abbildung 3 Wirkungsweise regulatorischer T-Zellen.....	23
Abbildung 4 Direkte Methode der Immunhistochemie.....	40
Abbildung 5 Indirekte Methode der Immunhistochemie.....	41
Abbildung 6 ABC-Methode.....	42
Abbildung 7 Arbeitsschritte des Färbeprotokolls zum immunhistochemischen Nachweis des Transkriptionsfaktors FOXP3 in der Niere.....	44
Abbildung 8 Arbeitsschritte des Färbeprotokolls zur immunhistochemischen Parallelfärbung der beiden Marker FOXP3 und CD4 an Paraffinschnitten	46
Abbildung 9 Graphische Schmelzkurvenanalyse eines qRT-PCR Amplifikats.....	56
Abbildung 10 Immunhistochemische Färbung von Nieren-, Nierenzellkarzinom- und Tonsillengewebe zur Detektion FOXP3 ⁺ Zellen.....	60
Abbildung 11 Etablierungsschritt der immunhistochemischen Färbemethode zum Nachweis FOXP3 ⁺ Zellen in der Niere.....	62
Abbildung 12 Immunhistochemische Färbung von FOXP3 nach dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokoll.....	63
Abbildung 13 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis FOXP3 ⁺ Zellen im NZK (links) und angrenzendem normalen Nierengewebe (rechts).....	65
Abbildung 14 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis FOXP3 positiver Zellen in 30 Primärtumoren (blau) sowie dem angrenzenden normalen Nierengewebe (rot)	66
Abbildung 15 Immunhistochemische Färbung zum Nachweis FOXP3 positiver Zellen in 30 Gewebeproben von Patienten mit histologisch gesichertem NZK.....	68
Abbildung 16 Immunhistochemischer Nachweis FOXP3 ⁺ Zellen im Primärtumor sowie angrenzendem Normalgewebe des Patienten Nr. 21.....	69

Abbildung 17 Konventionelle RT-PCR zur Untersuchung der FOXP3 Expression in 23 Primärtumoren (T) sowie dem angrenzenden normalen Nierengewebe (N) von Patienten mit histologisch nachgewiesenem NZK.....	71
Abbildung 18 RT-PCR zur Untersuchung der Expression des <i>Housekeeping</i> Gens HPRT1R in 23 Primärtumoren (T) sowie dem angrenzenden normalen Nierengewebe (N).....	72
Abbildung 19 Standardkurve zur Ermittlung der <i>real-time</i> RT-PCR Effizienz für die Amplifikation des <i>Housekeeping</i> Gens RPS9.....	73
Abbildung 20 Standardkurve zur Ermittlung der <i>real-time</i> RT-PCR Effizienz für die Amplifikation des <i>Housekeeping</i> Gens RPS9.....	74
Abbildung 21 Standardkurve zur Ermittlung der <i>real-time</i> RT-PCR Effizienz für die Amplifikation des Zielgens FOXP3.....	75
Abbildung 22 <i>Real time</i> RT-PCR zur Untersuchung der FOXP3 Expression in 23 Primärtumoren sowie angrenzendem normalen Nierengewebe.....	76
Abbildung 23 Etablierungsschritt der immunhistochemischen Färbemethode zum Nachweis des Oberflächenantigens CD4.....	79
Abbildung 24 Etablierungsschritt der immunhistochemischen Färbemethode zum Nachweis des Oberflächenantigens CD4.....	80
Abbildung 25 Immunhistochemische Färbung von CD4 nach dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokoll.....	81
Abbildung 26 Parallelfärbung von FOXP3 und CD4 an zwei direkt benachbarten Schnitten in der Niere (linke Spalte) sowie im Tumor (rechte Spalte).....	83

Literaturverzeichnis

American Cancer Society: Cancer facts and figures (2006):

http://www.cancer.org/docroot/PRO/content/PRO_1_1_Cancer_Statistics_2006_Presentation.asp

Ahmadzadeh M, Rosenberg ST (2006) IL-2 administration increases CD4(+)CD25(hi) Foxp3(+) regulatory T cells in cancer patients. *Blood* **107**(6): 2409-2414

Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai MY, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK (2005) The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4(+) Tregs. *Journal of Clinical Investigation* **115**(11): 3276-3284

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen ZB, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**(5597): 1395-1401

Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA, Restifo NP (2005) CD8+T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4(+) T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *Journal of Immunology* **174**(5): 2591-2601

Bach JF (2003) Regulatory T cells under scrutiny. *Nature Reviews Immunology* **3**(3): 189-198

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA (2001) CD4+CD25(high) regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of Immunology* **167**(3): 1245-1253

Baldewijns MML, van Vlodrop IJH, Schouten LJ, Soetekouw P, de Bruine AP, van Engeland M (2008) Genetics and epigenetics of renal cell cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **1785**(2): 133-155

Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E (2006) FOXP3(+) regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *European Journal of Immunology* **36**(11): 2832-2836

Barthlott T, Moncrieffe H, Veldhoen M, Atkins CJ, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B (2005) CD25(+)CD4(+) T cells compete with naive CD4(+) T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. *International Immunology* **17**(3): 279-288

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics* **27**(1): 20-21

Boenisch T, Farmilo A, Stead R, Key M, Welcher R, Atwood K (2003) *Handbuch Immunchemische Färbemethoden, 3. Auflage*: Boenisch, T

- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB (1995) CD28 Costimulation can promote T-cell survival by enhancing the expression of BCL-X(L). *Immunity* **3**(1): 87-98
- Brennan JF, Stilmant MM, Babayan RK, Siroky MB (1991) Acquired renal cystic-disease - implications for the urologist. *British Journal of Urology* **67**(4): 342-348
- Brenner H (2002) Long-term survival rates of cancer patients achieved by the end of the 20th century: a period analysis. *Lancet* **360**(9340): 1131-1135
- Bretscher PA (1999) A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(1): 185-190
- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* **27**(1): 68-73
- Burnet F (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Aust J Sci* **20**: 67
- Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, Cheung K, Hesdorffer C, Kim-Schulze S, Kaufman HL (2006) Characterization of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **24**(7): 1169-1177
- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: Mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annual Review of Immunology* **19**: 565-594
- Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP (1997) Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4(+) T cells. *Immunity* **7**(6): 885-895
- Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K (2005) Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(2): 419-424
- Chen WJ, Jin WW, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* **198**(12): 1875-1886
- Cheng L, Zhang SB, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R (2009) Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Human Pathology* **40**(1): 10-29

- Chikuma S, Imboden JB, Bluestone JA (2003) Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine* **197**(1): 129-135
- Chow WH, Gridley G, Fraumeni JF, Jarvholm B (2000) Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. *New England Journal of Medicine* **343**(18): 1305-1311
- Cohen HT, McGovern FJ (2005) Renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* **353**(23): 2477-2490
- Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA, Davis SJ (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* **17**(2): 201-210
- Curado M, Edwards B, Shin H, Storm H (2007) Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications, Lyon
- Curiel TJ, Coukos G, Zou LH, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen LP, Zou WP (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* **10**(9): 942-949
- Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang AJ, Dahm P, Chao N, Gilboa E, Vieweg J (2005) Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation* **115**(12): 3623-3633
- Dave DS, Lam JS, Leppert JT, Belldegrun AS (2005) Open surgical management of renal cell carcinoma in the era of minimally invasive kidney surgery. *Bju International* **96**(9): 1268-1274
- Deaglio S, Dwyer K M, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J F, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V K, Strom T B, Robson S C (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Keystone Symposium on Regulatory T Cells*; Feb; Vancouver, Canada. pp 1257-1265
- Delahunt B, Eble JN (2005) History of the development of the classification of renal cell neoplasia. *Clinics in Laboratory Medicine* **25**(2): 231-+
- Delidow BC, Peluso JJ, White BA (1989) Quantitative measurement of messenger-RNAs by polymerase chain-reaction. *Gene Analysis Techniques* **6**(6): 120-124
- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **193**(2): 233-238
- Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G (2000) Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *Bju International* **86**(1): 20-27

- Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR, Brown PO (2002) Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation (vol 99, pg 11796, 2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(23): 15245-15245
- Dillenburg W, Poulakis V, Skriapas K, de Vries R, Ferakis N, Witzsch U, Melekos M, Becht E (2006) Retroperitoneoscopic versus open surgical radical nephrectomy for large renal cell carcinoma in clinical stage cT2 or cT3a: Quality of life, pain and reconvalescence. *European Urology* **49**(2): 314-323
- Dutcher J, Szczylik C, Tannir N, Benedetto P, Ruff P, Hsu A, Berkenblit A, Thiele A, Strahs A, Feingold J (2007) Correlation of survival with tumor histology, age, and prognostic risk group for previously untreated patients with advanced renal cell carcinoma (adv RCC) receiving temsirolimus (TEMSR) or interferon-alpha (IFN). *J Clin Oncol* **25**: abstract 5033
- Dutcher J, Wilding G, Hudes G, Stadler W, Kim S, Tarazi J, Rosbrook B, Rini B (2008) Sequential axitinib (AG-013736) therapy of patients (pts) with metastatic clear cell renal cell cancer (RCC) refractory to sunitinib and sorafenib, cytokines and sorafenib, or sorafenib alone. *J Clin Oncol* **26**: abstract 5127
- Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I (2004) Tumours of the urinary system and male genital organs. IARC Press Lyon
- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N, Investigators AT (2007) Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **370**(9605): 2103-2111
- Estrada CR, Suthar AM, Eaton SH, Cilento BG (2005) Renal cell carcinoma: Children's Hospital Boston experience. *Urology* **66**(6): 1296-1300
- Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Geftter ML, Kamradt T (1996) Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: Evidence for T cell anergy (vol 26, pg 130, 1996). *European Journal of Immunology* **26**(4): 966-966
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology* **4**(12): 1206-1212
- Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4(+)CD25(-) T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *Journal of Immunology* **172**(9): 5149-5153
- Fazekas de St Groth B, Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Nanan R, Kelleher A (2006) Expression of IL-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T-cells within CD45RA and CD45RO compartments. *6th Annual Meeting of the Federation-of-Clinical-Immunology-Societies*; Jun 01-05; San Francisco, CA. pp S7-S7

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D (2004) Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon: IARC Press

Fife BT, Bluestone JA (2008) Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews* **224**: 166-182

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nature Immunology* **4**(4): 330-336

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology* **6**(11): 1142-1151

Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology* **6**(4): 331-337

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982) Prognostic-significance of morphologic parameters in renal-cell carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **6**(7): 655-663

Furtado GC, de Lafaille MAC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2002) Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *Journal of Experimental Medicine* **196**(6): 851-857

Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology* **4**(12): 941-952

Gattorno M, Ruprecht C, Gregorio A, Ferlito F, Martini A, Lanzavecchia A, Sallusto F (2004) Coexpression of CD25 and CD27 identifies Foxp3(+) regulatory T cells in inflamed synovia in juvenile idiopathic arthritis. *69th Annual Scientific Meeting of the American-College-of-Rheumatology/40th Annual Scientific Meeting of the Association-of-Rheumatology-Health-Professionals*; Nov 12-17; San Diego, CA. p 1155

George DJ, Kaelin WG (2003) The von Hippel-Lindau protein, vascular endothelial growth factor, and kidney cancer. *New England Journal of Medicine* **349**(5): 419-421

Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in induction of tolerance - role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**(5): 723-&

Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L (2005a) CD4(+) CD25(+) regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *Journal of Experimental Medicine* **202**(8): 1075-1085

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L (2005b) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4(+)CD25(+) regulatory T cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine* **202**(7): 919-929

- Ghysel C, Joniau S, van Poppel H (2006) The role of metastasectomy in renal cell carcinoma. *Eur Urol Suppl* **5**: 221 (abstract 794)
- Gold PJ, Fefer A, Thompson JA (1996) Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Semin Urol Oncol* **14**(4): 216-22
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ (2005) Cutting edge: Contact-mediated suppression by CD4(+)-CD25(+) regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology* **174**(4): 1783-1786
- Gorelik L, Constant S, Flavell RA (2002) Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **195**(11): 1499-1505
- Gorelik L, Flavell RA (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology* **2**(1): 46-53
- Greene JAL, Leytze GM, Emswiler J, Peach R, Bajorath J, Cosand W, Linsley PS (1996) Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *Journal of Biological Chemistry* **271**(43): 26762-26771
- Greenwald RJ, Boussiotis VA, Liorbach RB, Abbas AK, Sharpe AH (2001) CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* **14**(2): 145-155
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annual Review of Immunology* **23**: 515-548
- Gregori S, Bacchetta R, Passerini L, Levings MK, Roncarolo MG (2007) Isolation, expansion, and characterization of human natural and adaptive regulatory T cells. *Methods Mol Biol* **380**: 83-105
- Griffiths RW, Elkord E, Gilham DE, Ramani V, Clarke N, Stern PL, Hawkins RE (2007) Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunology Immunotherapy* **56**(11): 1743-1753
- Gross JA, Stjohn T, Allison JP (1990) The murine homolog of the lymphocyte-T antigen- CD28- molecular cloning and cell-surface expression. *Journal of Immunology* **144**(8): 3201-3210
- Grossman E, Messerli FH, Boyko V, Goldbourt U (2002) Is there an association between hypertension and cancer mortality? *American Journal of Medicine* **112**(6): 479-486
- Groux H, Ogara A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, deVries JE, Roncarolo MG (1997) A CD4(+) T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**(6652): 737-742

- Grubb RL, Choyke PL, Pinto PA, Linehan WM, Walther MM (2005) Management of von Hippel-Lindau-associated kidney cancer. *Nature Clinical Practice Urology* **2**(5): 248-255
- Grubb RL, Franks ME, Toro J, Middleton L, Choyke L, Fowler S, Torres-Cabala C, Glenn GM, Choyke P, Merino MJ, Zbar B, Pinto PA, Srinivasan R, Coleman JA, Linehan WM (2007) Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: A syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *Journal of Urology* **177**(6): 2074-2079
- Hafez KS, Fergany AF, Novick AC (1999) Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: Impact of tumorsize on patient survival, tumor recurrence and TNM staging. *Journal of Urology* **162**(6): 1930-1933
- Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ (1994) Comparative-analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands - expression and function. *Journal of Experimental Medicine* **180**(2): 631-640
- Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A (2000) TGF-beta 1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *European Journal of Immunology* **30**(9): 2639-2649
- Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol Unserer Zeit* **2**: 37
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**(5609): 1057-1061
- Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD (2008a) Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in Immunology* **29**(9): 429-435
- Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD (2008b) Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3(+)CD4(+) Treg. *European Journal of Immunology* **38**(4): 912-915
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques - a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **29**(4): 577-580
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IGH, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ, Global AT (2007) Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine* **356**(22): 2271-2281
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clinical Cancer Research* **9**(12): 4404-4408

- Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D (2000) Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell and Tissue Research* **301**(1): 85-99
- Jeron A, Pfoertner S, Bruder D, Geffers R, Hammerer P, Hofmann R, Buer J, Schrader AJ (2009) Frequency and Gene Expression Profile of Regulatory T Cells in Renal Cell Carcinoma. *Tumor Biology* **30**(3): 160-170
- Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **192**(9): 1213-1222
- Kaelin WG (2007) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and kidney cancer. *Medicina-Buenos Aires* **67**: 6-10
- Karube K, Ohshima K, Suzumiya J, Harada M, Kikuchi M (2004) FoxP3, a key molecule in CD4+CD25+ regulatory T cells, express in adult T cell leukemia/lymphoma cells and relates to clinicopathological features. *46th Annual Meeting of the American-Society-of-Hematology*; Dec 04-07; San Diego, CA. p 3255
- Kim WY, Kaelin WG (2004) Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of Clinical Oncology* **22**(24): 4991-5004
- Kirkali Z, Gill IS, Aron M (2007) The motion: Open partial nephrectomy is the standard of care for small resectable solid renal masses. *European Urology* **51**(2): 561-564
- Kojima A, Prehn RT (1981) Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune-diseases in mice. *Immunogenetics* **14**(1-2): 15-27
- Korman AJ, Peggs KS, Allison JP (2006) Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Advances in Immunology, Vol 90* **90**: 297-339
- Kovacs G (1993) Molecular cytogenetics of renal-cell tumors. *Advances in Cancer Research, Vol 62* **62**: 89-124
- Kovacs G, Erlandsson R, Boldog F, Ingvarsson S, Mullerbrechlin R, Klein G, Sumegi J (1988) Consistent chromosome-3p deletion and loss of heterozygosity in renal-cell carcinoma. INOMA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(5): 1571-1575
- Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF (1991) Cytogenetics of papillary renal-cell tumors. *Genes Chromosomes & Cancer* **3**(4): 249-255
- Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH (2003) The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunological Reviews* **193**(1): 58-69
- Kryczek I, Wei S, Zou LH, Zhu GF, Mottram P, Xu HB, Chen LP, Zou WP (2006) Cutting edge: Induction of B7-H4 on APCs through IL-10: Novel suppressive mode for regulatory T cells. *Journal of Immunology* **177**(1): 40-44

Kuczyk MA, Bokemeyer C, Kohn G, Stief CG, Machtens S, Truss M, Hofner K, Jonas U (1997) Prognostic relevance of intracaval neoplastic extension for patients with renal cell cancer. *British Journal of Urology* **80**(1): 18-24

Kundig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrucker HW, Sebzda E, Bachmann MF, Mak TW, Ohashi PS (1996) Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* **5**(1): 41-52

Lam JS, Shvarts O, Pantuck AJ (2004) Changing concepts in the surgical management of renal cell carcinoma. *European Urology* **45**(6): 692-705

Lang H, Jacqmin D (2003) Laparoscopic surgical treatment of localized renal cell carcinoma. *EAU Update Series* **1**: 226-229

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou FW, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng YK, Duan DSR, Dean M, Glavac D, Richards FM, Crossey PA, Fergusonsmith MA, Lepaslier D, Chumakov I, Cohen D, Chinault AC, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor-suppressor gene. *Science* **260**(5112): 1317-1320

Lenschow DJ, Bluestone JA (1993) T-cell Co-stimulation and in-vivo tolerance. *Current Opinion in Immunology* **5**(5): 747-752

Levings AK, Roncarolo MG (2005) Phenotypic and functional differences between human CD4(+)CD25(+) and type 1 regulatory T cells. *Cd4-Pluscd25-Plus Regulatory T Cells: Origin, Function and Therapeutic Potential* **293**: 303-326

Lindsten T, Lee KP, Harris ES, Petryniak B, Craighead N, Reynolds PJ, Lombard DB, Freeman GJ, Nadler LM, Gray GS, Thompson CB, June CH (1993) Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T-cells. *Journal of Immunology* **151**(7): 3489-3499

Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA (1991) Binding of the B-cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T-cell proliferation and interleukin-2 messenger-RNA accumulation. *Journal of Experimental Medicine* **173**(3): 721-730

Liu WH, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4(+) T reg cells. *Journal of Experimental Medicine* **203**(7): 1701-1711

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunology* **169**(5): 2756-2761

Ljungberg B, Hanbury D, Kuczyk M, Merseburger A, Mulders P, Patard J, Sinescu I (2007) Guidelines on renal cell carcinoma. pp 36-47. European Association of Urology: Pocket Guidelines, Edition 2007

Lonser RR, Glenn GM, Walther M, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH (2003) von Hippel-Lindau disease. *Lancet* **361**(9374): 2059-2067

Lundqvist A, Palmborg A, Pavlenko M, Levitskaya D, Pisa P (2005) Mature dendritic cells induce tumor-specific type 1 regulatory T cells. *Journal of Immunotherapy* **28**(3): 229-235

Mahabir S, Leitzmann MF, Virtanen MJ, Virtamo J, Pietinen P, Albanes D, Taylor PR (2005) Prospective study of alcohol drinking and renal cell cancer risk in a cohort of Finnish male smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **14**(1): 170-175

Malek TR, Bayer AL (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature Reviews Immunology* **4**(9): 665-674

Mandel JS, McLaughlin JK, Schlehofer B, Møller H, Helmer U, Lindblad P, McCredie M, Adami HO (1995) International renal-cell cancer study. 4. occupation. *International Journal of Cancer* **61**(5): 601-605

Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY (2005) TGF-beta 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* **201**(7): 1061-1067

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**(6733): 271-275

McCaughy TM, Hogquist KA (2008) Central tolerance: what have we learned from mice? *Seminars in Immunopathology* **30**(4): 399-409

Mejean A, Oudard S, Thiounn N (2003) Prognostic factors of renal cell carcinoma. *Journal of Urology* **169**(3): 821-827

Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology* **4**(10): 762-774

Mohammad A, McClintock C (2007) Renal cell carcinoma--a great mimicker. *Conn Med* **71**(2): 81-4

Morgan ME, van Bilsen JHM, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RRP, Huizinga TWJ, Ottenhoff THM, Toes REM (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in humans. *Human Immunology* **66**(1): 13-20

Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P, Mazumdar M (2002) Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **20**(1): 289-296

- Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Russo P, Berg WJ, Metz EM (2000) Effect of cytokine therapy on survival for patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **18**(9): 1928-1935
- Motzer RJ, Michaelson MD, Hutson TE, Tomczak P, Bukowski RM, Rixe O, Negrier S, Kim ST, Chen I, Figlin RA (2007) Sunitinib versus interferon (IFN)-alfa as first-line treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): updated efficacy and safety results and further analysis of prognostic factors. *Ejc Supplements* **5**(4): 4509
- Murphy K, Travers P, Walport M (2008) *Janeway's Immunobiology*, 7th edn: Garland Science, Taylor & Francis Group
- Mülhardt C (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*: Spektrum Akademischer Verlag
- Newton C, Graham A (1994) PCR: Spektrum Akademischer Verlag
- Nicodemus KK, Sweeney C, Folsom AR (2004) Evaluation of dietary, medical and lifestyle risk factors for incident kidney cancer in postmenopausal women. *International Journal of Cancer* **108**(1): 115-121
- Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000) *Praxis der Immunhistochemie.*: Urban & Fischer Verlag
- Nossal GJV (1994) Negative selection of lymphocytes. *Cell* **76**(2): 229-239
- Novick AC (2004) Laparoscopic and partial nephrectomy. *Clinical Cancer Research* **10**(18): 6322S-6327S
- Oida T, Xu LL, Weiner HL, Kitahi A, Strober W (2006) TGF-beta-mediated suppression by CD4(+)CD25(+) T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *Journal of Immunology* **177**(4): 2331-2339
- Okon K (2008) Pathology of Renal Tumors in Adults. Molecular Biology, Histopathological Diagnosis and Prognosis. *Polish Journal of Pathology* **59**(3): 129-176
- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E (1999) Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Research* **59**(13): 3128-3133
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* **65**(6): 2457-2464
- Peggs KS, Quezada SA, Allison JP (2008) Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunological Reviews* **224**: 141-165
- Peng YF, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA (2004) TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(13): 4572-4577

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**(9)

Pisani P, Parkin DM, Ferlay J (1993) Estimates of the worldwide mortality from 18 major cancers in 1985-implications for prevention and projections of future burden. *International Journal of Cancer* **55**(6): 891-903

Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Tjonneland A, Halkjaer J, Overvad K, Klipstein-Grobusch K, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Benetou V, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Monninkhof E, Peeters PHM, Bueno-de-Mesquita HB, Buchner FL, Ljungberg B, Hallmans G, Berglund G, Gonzalez CA, Dorronsoro M, Gurrea AB, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Kaaks R, Norat T, Slimani N, Riboli E (2006) Body size and risk of renal cell carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer* **118**(3): 728-738

Read S, Malmstrom V, Powrie F (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **192**(2): 295-302

Robert-Koch-Institut (2004) Robert Koch-Institut: Dachdokumentation Krebs: http://www.rki.de/cln_091/nn_204078/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Datenbankabfragen/Neuerkrankungen/neuerkrankungen__node.html?__nnn=true

Roncarolo MG, Levings MK (2000) The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* **12**(6): 676-683

Roth JS, Rabinowitz AD, Benson M, Grossman ME (1993) Bilateral renal-cell carcinoma in the Birt-Hogg-Dube-syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology* **29**(6): 1055-1056

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunological self-tolerance maintained by activated T-cells expressing interleukin-2 receptor alpha chain (CD25)- breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune-diseases. *Journal of Immunology* **155**(3): 1151-1164

Salomon B, Bluestone JA (2001) Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual Review of Immunology* **19**: 225-252

Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, Arcella J, Girvin AM, Padilla J, Miller SD, Bluestone JA (2001) Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice (vol 194, pg 677, 2001). *Journal of Experimental Medicine* **194**(9): 1393-1393

Schmidt LS, Nickerson ML, Angeloni D, Glenn GM, Walther MM, Albert PS, Warren MB, Choyke PL, Torres-Cabala CA, Merino MJ, Brunet J, Berez V, Borrás J, Sesia G, Middleton L, Phillips JL, Stolle C, Zbar B, Pautler SE, Linehan WM (2004) Early onset hereditary papillary renal carcinoma: Germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the met proto-oncogene. *Journal of Urology* **172**(4): 1256-1261

- Schrader A, Lauber J, Lechner O, Heidenreich A, Hofmann R, Buer J (2003) Application of Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction in Urological Oncology. *The Journal of Urology* **169**(5): 1858-1864
- Schrader AJ, Hofmann R (2008) Metastatic renal cell carcinoma: recent advances and current therapeutic options. *Anti-Cancer Drugs* **19**(3): 235-245
- Schrader AJ, Sevinc S, Olbert PJ, Hegele A, Varga Z, Hofmann R (2008) Gender-specific characteristics and survival of renal cell carcinoma. *Urologe* **47**(9): 1182-+
- Sepulveda J, Maroto P, Andres R, Diaz Padilla I, Coronado C, DelaRosa F, Castellano D (2008) Sorafenib as a second-line and sequential therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Analysis for safety and activity on sunitinib progressive pts. *J Clin Oncol* **26**: abstract 16100
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW (1993) Differential T-cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**(5121): 609-612
- Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, DiPaolo RA, Andersson J (2008) Role of TGF-beta in the Induction of Foxp3 Expression and T Regulatory Cell Function. *Journal of Clinical Immunology* **28**(6): 640-646
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S (2002) Stimulation of CD25+CD4+regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunology* **3**(2): 135-142
- Sica GL, Choi IH, Zhu GF, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB, Bajorath J, Chen LP (2003) B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* **18**(6): 849-861
- Siemer S, Hack M, Lehmann J, Becker F, Stockle M (2006) Outcome of renal tumors in young adults. *Journal of Urology* **175**(4): 1240-1243
- Siemer S, Lehmann J, Kamradt J, Loch T, Remberger K, Humke U, Ziegler M, Stockle M (2004) Adrenal metastases in 1,635 patients with renal cell carcinoma: Outcome and indication for adrenalectomy. *Journal of Urology* **171**(6): 2155-2159
- Sigman DB, Hasnain JU, Del Pizzo JJ, Sklar GN (1999) Real-time transesophageal echocardiography for intraoperative surveillance of patients with renal cell carcinoma and vena caval extension undergoing radical nephrectomy. *Journal of Urology* **161**(1): 36-38
- Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai DW, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berencsi K, Mastrangelo M, Herlyn D (2002) Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Research* **62**(18): 5267-5272

- Staehler M, Kruse J, Haseke N, Stadler T, Karl A, Bruns C, Graeb C, Jauch K, Stief C (2008) Effect of metastasectomy on survival in patients with metastatic Renal Cell Cancer: 10 years experience in 240 patients. *J Clin Oncol* **26**: abstract 5107
- Steinman RM, Nussenzweig MC (2002) Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(1): 351-358
- Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG (2002) The Subpopulation of CD4(+) CD25(+) splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *Journal of Immunology* **169**(5): 2461-2465
- Tai XG, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A (2005) CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature Immunology* **6**(2): 152-162
- Tang QZ, Bluestone JA (2008) The Foxp3(+) regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology* **9**(3): 239-244
- Thoenes W, Storkel S (1991) Pathology of benign and malignant renal-cell tumors. *Urologe-Ausgabe A* **30**(6): W41-W50
- Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ (1986) Histopathology and classification of renal-cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas) - the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathology Research and Practice* **181**(2): 125-143
- Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH (1989) CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(4): 1333-1337
- Thompson RH, Ordonez MA, Iasonos A, Secin FP, Guillonneau B, Russo P, Touijer K (2008) Renal cell carcinoma in young and old patients - Is there a difference? *Journal of Urology* **180**(4): 1262-1266
- Truong LD, Krishnan B, Cao JTH, Barrios R, Suki WN (1995) Renal neoplasm in acquired cystic kidney-disease. *American Journal of Kidney Diseases* **26**(1): 1-12
- Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Houghton AN (2004) Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* **200**(6): 771-782
- Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A (2004) IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Immunology* **172**(10): 5986-5993
- Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* **8**(7): 523-532

- Vigui r M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L (2004) Foxp3 expressing CD4(+)CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *Journal of Immunology* **173**(2): 1444-1453
- Viola A, Lanzavecchia A (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* **273**(5271): 104-106
- Vira MA, Novakovic KR, Pinto PA, Linehan WM (2007) Genetic basis of kidney cancer: a model for developing molecular-targeted therapies. *Bju International* **99**(5): 1223-1229
- Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA (1996) CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *Journal of Experimental Medicine* **183**(6): 2541-2550
- Wang HY, Lee DA, Peng GY, Guo Z, Li YC, Kiniwa Y, Shevach EM, Wang RF (2004) Tumor-specific human CD4(+) regulatory T cells and their ligands: Implications for immunotherapy. *Immunity* **20**(1): 107-118
- Wang RF (2006) Immune suppression by tumor-specific CD4(+) regulatory T-cells in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **16**(1): 73-79
- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* **270**(5238): 985-988
- Weiss LM, Gelb AB, Medeiros LJ (1995) Adult renal epithelial neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology* **103**(5): 624-635
- Welsch U (2006) *Lehrbuch Histologie*: Urban & Fischer Verlag
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH (2001) Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research* **61**(12): 4766-4772
- Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM (2003) Direct expansion of functional CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* **198**(2): 235-247
- Zang XX, Loke P, Kim J, Murphy K, Waitz R, Allison JP (2003) B7x: A widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(18): 10388-10392
- Zheng S G, Gray J D, Yamagiwa S, Ohtsuka K, Horwitz D A (2002) Generation of TGF-beta producing regulatory T cells ex-vivo from CD4+ CD25- precursors. *66th Annual Scientific Meeting of the American-College-of-Rheumatology/37th Annual Scientific Meeting of the Association-of-Rheumatology-Health-Professionals*; Oct 24-29; New Orleans, Louisiana. pp S487-S487

Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA (2006) TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4(+) CD25(+) regulatory cells. *Journal of Immunology* **176**(6): 3321-3329

Zhou G, Drake CG, Levitsky HI (2006) Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* **107**(2): 628-636

Zou LH, Barnett B, Safah H, LaRussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P, Wei SN, David O, Curiel TJ, Zou WP (2004) Bone marrow is a reservoir for CD4(+)CD25(+) regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Research* **64**(22): 8451-8455

Zou W (2006) Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews* **6**

Zou W P, Zou L H, Mottram P, Chen L P, Kryczek I (2005) Immunosuppressive network in human tumor environment and its therapeutic relevance. *Experimental Biology 2005 Meeting/35th International Congress of Physiological Sciences*; Mar 31-Apr 06; San Diego, CA. pp A361-A361

Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andres J. Schrader für die Betreuung dieser Arbeit, die Unterstützung in der Erarbeitung der wesentlichen Aspekte im Hinblick auf die Fragestellung sowie die stets rasche Durchsicht und konstruktive Kritik im Entstehungsprozess der Arbeit.

Ich danke dem Institut für Pathologie für die Bereitstellung des fixierten und eingebetteten Gewebes sowie Herrn Prof. Dr. Peter Barth für zahlreiche Anregungen zur Auswertung der immunhistochemischen Methoden.

Mein besonderer Dank gilt den medizinisch technischen Assistentinnen Frau Oplesch und Frau Zimmermann, die mir mit ihren methodischen Kenntnissen immer zur Seite standen und auch moralisch eine große Unterstützung waren.

Ich danke Herrn Dr. Martin A. Thomas für anregende fachliche Diskussionen sowie die Unterstützung bei der Fotodokumentation.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Till Adhikary für hilfreiche Vorschläge bei der Lösung molekularbiologischer Probleme.

Zuletzt möchte ich Freunden und Verwandten danken, die mit ihrer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Aumüller, Basler, Baum, Barth, Becker, Benes, Berger, Bertalanffy, Beul, Bien, Boudriot, Busch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Duda, Eilers, Feuser, Fritz, Funck, Gamsa, Gerdes, Geus, Gotzen, Griss, Grimm, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Hellinger, Hellwig, Hertl, Herzum, Hesse, Hinrichs, Hofmann, Hörle, Hoyer, Huber, Jungclas, Kalder, Kann, Kill, Klaus, Klenk, Klose, Koch, Koolman, König, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühn, Lammel, Lengsfeld, Likoyiannis, Lang, Langer, Lill, Lohoff, Lotz, Löffler, Maisch, Mandrek, Mann, Max, McGregor, Meier, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Nachtigall, Neubauer, Oertel, Olbert, Reinalter, Remschmidt, Renz, Rothmund, Röhm, Röper, Schäfer, Schierl, Schmidt, Schmitz, Schnabel, Schneyer, Schrader, Schultz, Schwarz, Seitz, Sekundo, Seyberth, Steiniger, Stiletto, Stempel, Studer, Sundermeyer, Sure, Suske, Thomas, Varga, Vogelmaier, Vogt, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wilke, Wirth, Wulf